

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE L'EXPOSITION CHRONIQUE AUX PESTICIDES SUR LE STATUT
PHYSIOLOGIQUE DU POISSON D'EAU DOUCE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

MARTINE CAMIRÉ

JANVIER 2007

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Alice Hontela de m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'Université du Québec à Montréal et aussi à l'Université de Lethbridge, en Alberta, et pour la confiance qu'elle m'a attribuée. Je désire aussi remercier mon co-directeur, Philip Spear, pour son aide sur le terrain et ses conseils pour l'exposition des poissons en laboratoire. Pierre Dumont du Ministère des Ressources naturelles et de la Faune (MRNF) pour ses commentaires constructifs. Aussi, une chère collègue et amie, Alexandra Gagnon, pour son soutien et son aide sur le terrain et en laboratoire.

J'aimerais aussi remercier tous les gens qui ont participé à mes campagnes d'échantillonnages sur le terrain ou en laboratoire : Catherine Bourdeau, Charles Deblois, Jocelyn Dorval, Guylaine Ducharme, Denis Flipo, Isabelle Gariépy, Gregory Kramer, Vincent Leblond, Isabelle Picard, Joseph Rasmussen et Lukas Rasmussen. Merci à Christian Deblois et Nathalie Dassylva du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) et à Pierre Lafrance et Pauline Fournier de l'Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-EAU) pour les analyses des pesticides dans l'eau. Merci aux gentils techniciens du MRNF pour leur aide avec les pêches électriques, Yvon Richard et Julie Roger ainsi qu'au personnel animalier de l'UQAM (Luc Gladu et Sophie Ouellet) pour avoir pris soin de mes poissons. Merci à Daniel Rivet de l'UQAM pour son aide et sa disponibilité. Pour leur soutien, merci à mes chers parents France et Normand, à ma soeur Nathalie. Enfin, pour son aide lors de l'échantillonnage et son soutien très apprécié, merci à Jean-François Ouellet.

Ce projet d'étude a été financé par le CNTC (Canadian Network of Toxicology Centers) et le Réseau de recherche en écotoxicologie du Saint-Laurent (RRESL) par l'octroi d'un financement du VRQ (Valorisation Recherche Québec). Remerciement à ma directrice Alice Hontela, à la fondation UQAM ainsi qu'au Centre de recherche en toxicologie environnementale (TOXEN) pour m'avoir attribué, une bourse d'étude personnelle, une bourse d'excellence UQAM ainsi qu'une bourse TOXEN.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
RÉSUMÉ.....	viii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
Le métolachlore.....	3
Le cortisol et la réponse au stress.....	9
Les perturbateurs endocriniens et les effets sur la réponse au stress.....	11
L'activité de la Na ⁺ /K ⁺ -ATPase des branchies.....	13
Le glucose plasmatique et le glycogène hépatique.....	14
L'activité des acétylcholinestérases	14
L'hématocrite	15
Le facteur de condition et l'indice hépatosomatique.....	16
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES	17

CHAPITRE I

EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO METOLACHLOR ON THE PHYSIOLOGICAL STATUS OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

1.1 ABSTRACT	20
1.2 INTRODUCTION	21
1.3 MATERIALS AND METHODS.....	24
1.3.1 Experimental animals	24
1.3.2 Metolachlor exposure <i>in vitro</i>	24
1.3.2.1 Preparation of interrenal cell suspension.....	24
1.3.2.2 Exposure of interrenal cells to metolachlor	24
1.3.3 Metolachlor exposure <i>in vivo</i>	25
1.3.3.1 Pesticide analysis.....	25

1.3.3.2 Sampling	25
1.3.3.3 Biochemical analyses	26
1.4 STATISTICAL ANALYSIS	27
1.5 RESULTS	28
1.5.1 Metolachlor concentrations in treatment tank water during <i>in vivo</i> metolachlor exposure	28
1.5.2 Effects of metolachlor exposure on HPI axis (<i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> assessment)...	28
1.5.3 Effects of metolachlor exposure on the physiological status	29
1.6 DISCUSSION	35
1.7 ACKNOWLEDGMENTS	41
1.8 REFERENCES	42

CHAPITRE II

ÉVALUATION DU STATUT PHYSIOLOGIQUE DU POISSON D'EAU DOUCE EXPOSÉ AUX PESTICIDES ET AUTRES POLLUANTS AGRICOLES EN MILIEU NATUREL

2.1 RÉSUMÉ	50
2.2 INTRODUCTION	51
2.3 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	55
2.3.1 Région à l'étude	55
2.3.2 Analyse de l'eau	55
2.3.3 Choix de l'espèce sentinelle: la perchaude (<i>Perca flavescens</i>)	56
2.3.4 Campagnes d'échantillonnage	56
2.3.5 Capture de la perchaude	58
2.3.6 Prélèvements	58
2.3.7 Analyse des biomarqueurs	58
2.4 STATISTIQUES	59
2.5 RÉSULTATS	60
2.6 DISCUSSION	68
2.7 CONCLUSION	74
DISCUSSION GÉNÉRALE	76
PERSPECTIVES.....	80

APPENDICE A	
SYNTHÈSE DES EFFETS DE L'EXPOSITION CHRONIQUE AU	
MÉTOLACHLORE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL	81

APPENDICE B	
IDENTIFICATION D'UN POISSON D'EAU DOUCE EN GUISE DE SENTINELLE	
POUR L'ÉVALUATION DE LA PRÉSENCE D'INHIBITEUR DES	
CHOLINESTÉRASES EN MILIEU AQUATIQUE	83

RÉFÉRENCES.....	87
-----------------	----

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. Concentrations environnementales, expérimentales et toxiques de métolachlore	5
2. Voie métabolique du métolachlore (modifié de Cruz <i>et al.</i> 1993)	8
1.1. ACTH-stimulated cortisol secretion and cell viability	30
1.2. Plasma cortisol, gill Na^+/K^+ -ATPase activity, hematocrit and plasma acetylcholinesterase activity	32
1.3. Plasma glucose, hepatic glycogen and hepatosomatic index	33
1.4. Condition factor	34
2.1. Image satellite modifiée montrant la qualité de l'eau, l'étendue des terres agricoles ainsi que les sites de capture de la perchaude sur le bassin versant de la rivière Yamaska	54
A-1 Synthèse des effets de l'exposition chronique au métolachlore (en milieu contrôlé/eau douce) chez la truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) sur les différents biomarqueurs utilisés et effets proposés en italique	82
B-1 Activité des cholinestérases plasmatiques (moyenne \pm SD) pour plusieurs espèces de poissons capturés du 30 septembre au 6 octobre 2002 dans la rivière Yamaska (milieu contaminé par les pesticides) et dans le lac Brome (site de référence exempt de pesticides).	85
B-2 Activité des cholinestérases plasmatiques chez le brochet capturé en milieu contaminé par les pesticides, Rivière Yamaska et en milieu exempt de pesticides, lac Brome, en fonction du log 10 poids (g).	86

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Water metolachlor concentrations (mean \pm S.E.) in the four treatments of the <i>in vivo</i> metolachlor exposure	31
2.1 Pesticides ($\mu\text{g/l}$) détectés du 4 au 12 juin 2002 à plusieurs stations d'échantillonnage de la rivière Yamaska	62
2.2 Données physicochimiques et pesticides détectés du 6 au 10 juin 2003 dans l'eau de surface des sites d'échantillonnage de la campagne n° 2.....	63
2.3 Pesticides ($\mu\text{g/l}$) détectés le 4 août 2003 dans l'eau de surface des régions échantillonnées lors de la campagne n° 3	64
2.4 Campagne n° 1 Indices morphométriques et valeur des biomarqueurs (moyenne \pm erreur type) des perchaudes capturées à la senne au site de référence BR2002 et au filet maillant au site YAM-03 en 2002.....	65
2.5 Campagne n° 2 Indices morphométriques et valeur des biomarqueurs (moyenne \pm erreur type) des perchaudes capturées à la senne au site de référence BR2003 et au site contaminé par les pesticides YAM-02 en juin 2003.....	66
2.6 Campagne n° 3 Indices morphométriques et valeur des biomarqueurs (moyenne \pm erreur type ou min.-max.) des perchaudes capturées à la pêche électrique au site de référence faiblement contaminé par les pesticides YAM-N et au site contaminé par les pesticides YAM-01 en septembre 2003	67

RÉSUMÉ

La contamination des eaux de surface par les polluants agricoles soulève des inquiétudes concernant les effets potentiels sur les organismes aquatiques.

L'objectif général de ce projet de maîtrise était d'évaluer le statut physiologique du poisson d'eau douce exposé de façon chronique aux pesticides et autres polluants agricoles. Dans un premier volet, des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont été exposées durant 30 jours à un herbicide communément détecté dans les cours d'eau agricoles, le métolachlore, à des concentrations de 200, 500 et 800 µg/l. Une exposition au métolachlore en microplaque avec des cellules interrénales de truites arc-en-ciel (cellules qui sécrètent le cortisol) a aussi été réalisée. Dans un second volet, des perchaudes ont été capturées à trois reprises entre 2002 et 2003 dans la rivière Yamaska (Québec, Canada), qui est contaminée par les pesticides et autres polluants agricoles. À chacune des campagnes, un site non contaminé (lac Brome) ou très faiblement contaminé par les pesticides (rivière Yamaska Nord) était utilisé comme site de référence. Pour les deux volets, des fonctions biologiques ont été évaluées à l'aide de biomarqueurs : la fonction endocrinienne par le cortisol plasmatique; l'osmorégulation par l'activité de l'enzyme branchiale Na^+/K^+ -ATPase et le métabolisme énergétique par le glucose plasmatique et le glycogène hépatique. L'activité de l'acétylcholinestérase plasmatique a été évaluée comme biomarqueur d'exposition aux inhibiteurs de cholinestérases. Enfin, des indices de condition tels que le facteur de condition, l'indice hépatosomatique et l'hématocrite ont permis de caractériser la condition générale des poissons.

Les résultats obtenus pour le volet réalisé en laboratoire révèlent que les truites arc-en-ciel sont peu affectées par une exposition au métolachlore allant jusqu'à 800 µg/l. Une augmentation de l'hématocrite est toutefois notée à l'exposition de 200 µg/l de métolachlore. À 800 µg/l, les truites sont beaucoup plus sensibles au stress de capture. De plus, une perturbation du système d'osmorégulation est révélée par une hausse de l'activité Na^+/K^+ -ATPase des branchies, une diminution de l'hématocrite et des réserves énergétiques. L'exposition en microplaque montre que les cellules interrénales sont très résistantes au métolachlore en terme de viabilité cellulaire (concentration létale pour 50% des cellules $\text{CL}_{50} = 1092 \text{ mg/l}$). Cependant, la concentration effective qui diminue de 50% la libération de cortisol est beaucoup plus faible ($\text{CE}_{50} = 79 \text{ mg/l}$), ce qui suggère un potentiel de perturbateur endocrinien *in vitro*. Les résultats du volet réalisé en milieu naturel indiquent, pour la seconde campagne d'échantillonnage, que le milieu contaminé par les pesticides et autres polluants agricoles n'affecte pas significativement l'activité des cholinestérases plasmatiques, bien que celle-ci tende à baisser. Ce milieu affecte toutefois négativement la croissance des perchaudes et perturbe la réponse cortisolique. Les perchaudes ont une accumulation de glycogène hépatique et un indice hépatosomatique plus élevé. L'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPase des branchies est plus élevée.

Les résultats de ces études ont permis de dresser un portrait des effets des pesticides et autres polluants agricoles sur le statut physiologique du poisson. Ainsi, en approfondissant les

différents biomarqueurs affectés, des études ultérieures pourront permettre d'évaluer l'état de santé des poissons.

Mots clés : perchaude, truite arc-en-ciel, métolachlore, pesticide, cortisol, perturbation endocrinienne, osmorégulation, hématocrite, glycogène, acétylcholinestérase, rivière Yamaska.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La concurrence mondiale pour les ressources alimentaires a un impact majeur sur les méthodes de cultures. Celles-ci se doivent d'être productives et d'assurer une qualité optimale de l'aliment. Pour en arriver à cette fin, les producteurs ont recours à la croissance en monoculture. Bien que ce type de culture soit très productif, il est hautement vulnérable aux insectes ravageurs, champignons et mauvaises herbes. C'est pourquoi la croissance en monoculture va de pair avec l'utilisation d'insecticides, de fongicides et d'herbicides. En 2001, la dépense mondiale reliée à l'achat de pesticides totalisait près de 30 milliards de dollars (U.S.). Toujours au niveau mondial, plus de 2,3 milliards de kg de pesticides étaient utilisés en 2001, dont 70% était destiné au secteur agricole (U.S. EPA, 2004). Cette utilisation de pesticides a un impact subtil sur l'environnement. La source du problème réside dans le fait que certains pesticides sont persistants et qu'ils se disséminent dans l'environnement. Ultiment, ils finissent par contaminer les milieux aquatiques. En conséquence, une multitude de pesticides est détectée dans de nombreux tributaires drainant les régions agricoles (Battaglin *et al.*, 2000; Clark et Goolsby, 2000; Scribner *et al.*, 2000; Graymore *et al.*, 2001; Giroux, 2002; Osano *et al.*, 2003; Kolpin *et al.*, 2004). Au Québec, les pesticides sont principalement détectés durant les mois de juin, juillet et août (Giroux, 2002). Conséquemment, les poissons et autres organismes aquatiques se retrouvent exposés à ces substances chimiques de façon continue durant la saison estivale, ce qui soulève des inquiétudes.

Parmi les pesticides les plus fréquemment détectés dans les cours d'eau de régions agricoles se retrouve l'herbicide métolachlore. Bien qu'il soit utilisé depuis plus de 25 ans, les effets d'une exposition sous-létale de longue durée sur les poissons ont été peu étudiés (U.S. EPA, 1995; Giroux, 2002; Takacs *et al.*, 2002). Comme pour la plupart des pesticides, la toxicité aiguë du métolachlore est connue pour plusieurs espèces de poissons. La toxicité aiguë est déterminée suite à l'exposition de groupes de poissons à des concentrations croissantes du pesticide afin de déterminer la concentration qui, en 96 heures, tue 50 % de la population (concentration létale 50 ou CL50). Ce type d'étude utilise des concentrations supérieures aux concentrations retrouvées dans les eaux de surface contaminées. En conditions

environnementales, les organismes sont plutôt exposés à des concentrations faibles, mais pour une durée d'exposition beaucoup plus longue. Il s'agit de l'exposition chronique. Les tests visant à déterminer la concentration à laquelle il y aura une toxicité chronique sont plus complexes, plus onéreux et plus longs à effectuer. L'exposition au pesticide peut durer un mois ou plus. Contrairement aux tests permettant de déterminer la toxicité aiguë, ce test permet de mettre en évidence les effets sous-létaux, notamment des changements hormonaux, l'activation de certains mécanismes de défense et l'activation d'enzymes spécifiques. Ce qui nécessite une évaluation plus exhaustive que l'évaluation simple de la mortalité. Ainsi, en raison de la complexité des études chroniques, elles se font beaucoup plus rares que les études de toxicité aiguë. Toutefois, elles ont l'avantage de pouvoir détecter de façon plus sensible, bien avant la mortalité, certains effets sur le poisson. De plus, elles permettent de comprendre les mécanismes de toxicité qui agissent à plus long terme. Il est important de connaître et comprendre les effets apportés par des concentrations plus faibles que les concentrations létales afin d'établir des normes environnementales plus réalistes pour la protection de la vie aquatique. Or, pour le métolachlore, les effets d'une exposition chronique chez le poisson sont peu connus.

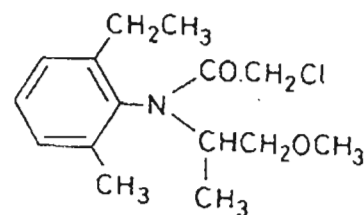
En ajout à la toxicité potentielle spécifique au métolachlore, les effets chez le poisson d'une exposition simultanée à une multitude de pesticides et autres polluants agricoles présents dans son environnement naturel sont peu connus. Puisque les poissons sont exposés de façon chronique, des craintes sont soulevées concernant les effets que peuvent avoir ces expositions sous-létales sur la santé des individus, de leur population ainsi que de l'écosystème aquatique.

À l'intérieur de la prochaine section sera présenté l'état des connaissances concernant l'herbicide métolachlore, le cortisol, la réponse au stress et sa perturbation ainsi que les biomarqueurs utilisés dans le cadre de ce projet de maîtrise. Par la suite suivra le chapitre I, présenté sous forme d'article scientifique et traitant de l'exposition du poisson d'eau douce à l'herbicide métolachlore en milieu contrôlé. Ensuite, le chapitre II présentera les effets de l'exposition du poisson d'eau douce à l'ensemble des polluants agricoles en milieu naturel. Enfin suivront une discussion générale ainsi qu'une conclusion générale regroupant les deux volets du projet de maîtrise.

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Le métolachlore

Le métolachlore, 2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-ethoxy-1-methylethyl) acétamide, est un herbicide à large spectre de la famille des chloroacétanilides (Takacs *et al.*, 2002). Synthétisé par la compagnie Ciba-Geigy en 1972 et homologué en 1976, cet herbicide était auparavant utilisé pour le contrôle général des mauvaises



Métolachlore

herbes dicotylédones sur les pelouses. Actuellement, il est principalement utilisé pour le contrôle général des mauvaises herbes dans diverses cultures telles que le maïs, le soya, la pomme de terre, la betterave à sucre, le semis d'épinette, les arbres fruitiers ainsi que le coton. Il est appliqué sur les champs avant l'émergence des plantules et empêche la croissance des espèces non-désirables telles que la morelle noire de l'est (*Solanum ptycanthum*), la digitale sanguine (*Digitaria sanguinalis*) et astringente (*Digitaria ischaemum*), l'échinochloa pied-de-coq (*Echinochloa crusgalli*) et la panique d'automne (*Panicum dichotomiflorum*). De façon similaire aux autres acétamides, le métolachlore est absorbé par les racines et les tiges émergentes. Bien que le mécanisme par lequel il confère sa toxicité ne soit pas encore clair, il est reconnu comme inhibiteur de la synthèse des très longues chaînes d'acides gras (C20-C36) (Shaner, 2003). Il est suspecté d'interférer avec l'acétyl-COA ou de se lier de façon irréversible aux enzymes élongases impliquées dans l'élongation des acides gras (Schmalfuss *et al.*, 2000; Shaner, 2003). De plus, le métolachlore inhibe l'activité enzymatique du système antioxydant (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) de façon dose-dépendante et induit le stress oxydatif chez certaines graines de végétaux (Stajner *et al.*, 2003). Enfin, de multiples processus biochimiques, notamment la synthèse de la chlorophylle, des protéines, des lipides, des acides gras, des isoprénoides (gibbérélines) et des flavonoïdes, sont perturbés par l'herbicide (Peterson *et al.*, 2001).

Le métolachlore peut être le seul composant d'une formule commerciale (Dual ®) ou être jumelé à un autre pesticide tel que l'atrazine (Primextra Light ®) (Takacs *et al.*, 2002).

Suivant son application, le temps nécessaire à la disparition de 50 % du composé (TD50) dans le sol varie de 7 à 292 jours. La persistance environnementale est donc considérable. La vitesse de la dégradation varie selon la composition microbienne et l'humidité du sol (Bollag *et al.*, 1986), la température (Gerstl, 1991), la concentration en radicaux hydroxyles (Webster *et al.*, 1998) et les radiations UV (Osano *et al.*, 2003). Les résidus les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement sont les métabolites acide éthane sulfonique et acide oxanilique. Ces deux métabolites ont une persistance environnementale pouvant atteindre une durée de quatre ans dans le sol (Takacs *et al.*, 2002). De plus, le métolachlore est modérément à hautement mobile dans les sols. Il possède une grande solubilité dans l'eau (530 mg/L) et peut être transporté vers divers compartiments de l'environnement par la volatilisation, le vent, l'érosion et le lessivage (Takacs *et al.*, 2002). En conséquence, il est fréquemment détecté dans les cours d'eau (Giroux, 2002; Takacs *et al.*, 2002), les eaux souterraines, les puits résidentiels (U.S. EPA, 1987; Battaglin *et al.*, 2000; Kolpin *et al.*, 2000), l'air (Foreman *et al.*, 2000), la pluie (Goolsby *et al.*, 1997; Majewski *et al.*, 2000) et même le brouillard arctique (Rice et Chernyak, 1997). Le métolachlore est souvent le deuxième pesticide, suivant l'atrazine, le plus communément retrouvé en milieu aquatique en terme de fréquence de détection et de concentration (Frank *et al.*, 1991; Giroux, 2002). Bien que le phénomène de bioaccumulation du métolachlore soit peu étudié, le coefficient de partition octanol-eau ($\log K_{oe}$) est de 3,45, ce qui signifie qu'il a un potentiel de bioaccumulation dans les organismes vivants (W.H.O., 2003).

La Figure 1 met en perspective quelques concentrations environnementales de métolachlore, des critères de protection des eaux, quelques concentrations létales (CL50) ou concentration sans effet observé (CSEO) sur la reproduction du poisson ainsi que les concentrations utilisées pour l'exposition de la truite arc-en-ciel au métolachlore au cœur de la présente étude. De plus, cette figure permet de constater l'importance de la durée de l'exposition en toxicologie.

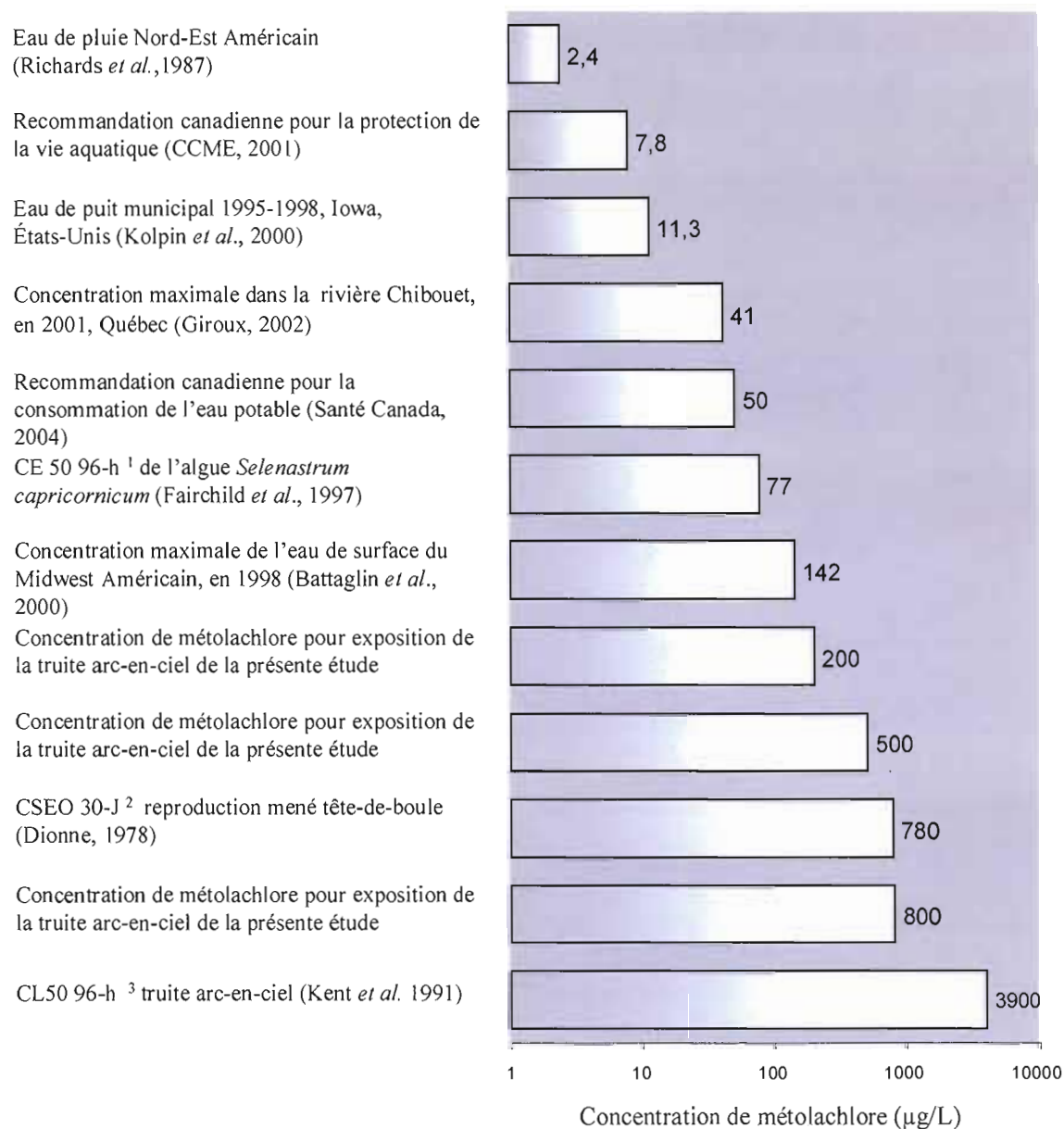


Fig.1. Concentrations environnementales, expérimentales et toxiques de métolachlore

¹ Concentration effective i.e. inhibant la croissance cellulaire de 50 % de la population de l'algue (*Selenastrum capricornicum*) en exposition de 96 heures au métolachlore.

² Concentration sans effets observables sur la reproduction du mené tête de boule en exposition de 30 jours au métolachlore.

³ Concentration causant la létalité chez 50 % de la population de truite arc-en-ciel soumise à une exposition de 96 heures au métolachlore.

L'omniprésence du métolachlore à l'échelle globale soulève des inquiétudes relatives à sa toxicité chronique sur les organismes non ciblés. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) a classé cet herbicide comme carcinogène potentiel pour l'humain (Groupe C) (Takacs *et al.*, 2002). Aussi, des études ont révélé la présence de tumeur hépatique et d'atrophies testiculaires chez le rat exposé de façon chronique (U.S. EPA, 1987). Une attention particulière est portée sur la faune et la flore aquatiques, vu la contamination fréquente de leur milieu de vie et leur exposition en continu. Le métolachlore est hautement toxique pour les plantes vasculaires aquatiques (U.S. EPA, 2002). De plus, les recherches de Fairchild *et al.* (1997) ont montré que les herbicides acétanilides avaient une toxicité élevée pour l'algue verte unicellulaire (*Selenastrum capricornicum*) (Figure 1) et la plante vasculaire flottante (*Lemna minor*). Cette perte de biodiversité peut entraîner des conséquences indirectes importantes, notamment en termes de nourriture et d'habitat, sur les maillons supérieurs de la chaîne trophique. D'autres maillons de la chaîne trophique peuvent aussi être affectés par l'exposition au métolachlore. Des études de toxicité aiguë pour les organismes aquatiques d'eau douce ont montré que le métolachlore était légèrement à modérément toxique pour certains organismes invertébrés et poissons (U.S. EPA, 2002). La truite arc-en-ciel est parmi les espèces ichthyologiques les plus sensibles au métolachlore, sa CL50 96 heures est de 3,9 mg/L (Kent *et al.*, 1991). Bien que les concentrations létales lors d'une exposition aiguë soient connues et disponibles dans la littérature pour de nombreuses espèces, la documentation concernant les effets d'une exposition de longue durée à des concentrations environnementales (exposition chronique) se fait rare.

Jusqu'à présent, quelques études ont évalué le métabolisme du métolachlore et l'effet de l'exposition chronique sur la reproduction du poisson. En évaluant le métabolisme du métolachlore dans le poisson, Cruz *et al.* (1993) ont montré qu'il est directement absorbé par le tractus gastro-intestinal du poisson. La molécule du métolachlore contient un atome de chlore qui réagit activement avec les nucléophiles tels le glutathion (GSH), qui est un antioxydant, et les protéines contenant un groupement -SH (thiol). Chez le rat, le métolachlore (ou son métabolite) est largement lié aux globules rouges (U.S. EPA, 2001). Il s'accumule ensuite dans la plupart des tissus, mais de façon plus importante dans le foie. Suivant une exposition chronique à 1 mg/L durant 34 jours chez le crapet arlequin (*Lepomis*

macrochirus), les résidus retrouvés dans la chair et le foie étaient respectivement de 13,9 ppm et 220,3 – 250,8 ppm (Cruz *et al.*, 1993). Le foie est l'organe majeur de la biotransformation du métolachlore. Cet herbicide active certaines enzymes du cytochrome P450 après 24 h d'exposition *in vitro* des cellules dérivant d'hépatome de rat et d'humain (Dierickx, 1999). Les voies de détoxification de la molécule (Figure 2) passent par la O-déméthylation et l'hydroxylation du groupement benzylméthyle suivi de la conjugaison au glucuronide et d'une déchlorination avec conjugaison subséquente au glutathion (Cruz *et al.*, 1993). Une fraction de la dose orale conjuguée au glutathion est excrétée dans l'intestin via la bile. Ensuite, suivant une nouvelle biotransformation, une réabsorption partielle a lieu à travers la paroi intestinale constituant une circulation entérohépatique (U.S. EPA, 2001). Comme l'élimination du métolachlore nécessite la molécule GSH, le métolachlore est soupçonné d'induire un épuisement de cet antioxydant et ainsi augmenter la vulnérabilité de certains tissus à faibles niveaux de GSH comme le sang, l'estomac et les tissus nasaux (U.S. EPA, 2001). De plus, lors du processus de biotransformation dans le foie, un métabolite intermédiaire toxique, le formaldéhyde, peut être formé (U.S. EPA, 2001).

Les effets d'une exposition chronique au métolachlore chez le poisson sont peu connus. Une étude chronique a toutefois montré que la concentration à laquelle aucun effet n'est apparent (NOEC) pour la reproduction du poisson tête-de-boule (*Pimephales promelas*) exposé durant 4 semaines est de 780 µg/L (Dionne, 1978). Les effets sur le système reproducteur apparaissent donc à des concentrations relativement supérieures à celles retrouvées en conditions environnementales.

Les études effectuées jusqu'à présent ne permettent pas de mettre en évidence les autres effets du métolachlore sur le statut physiologique du poisson. En évaluant plusieurs mécanismes physiologiques à l'aide de biomarqueurs, cette étude a pour but de déterminer les cibles potentielles pouvant être affectées par le métolachlore chez le poisson exposé de façon chronique.

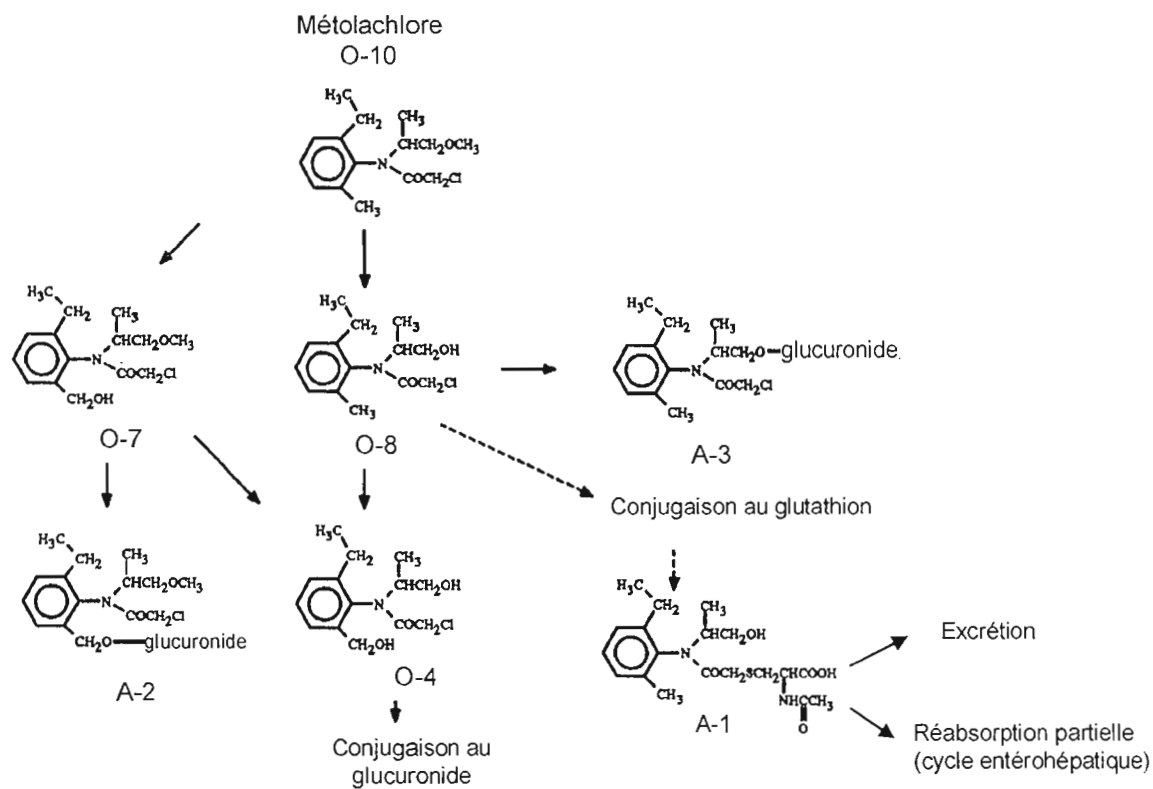


Figure 2. Voie métabolique du métolachlore (modifié de Cruz *et al.* 1993)

Le cortisol et la réponse au stress

Comme chez tous les vertébrés, lorsque le poisson est exposé à un facteur de stress (stimulus suffisamment puissant pour perturber l'équilibre interne et engendrer la réponse au stress), il y a activation de la réponse au stress (Breuner et Orchinik, 2002). Cette réponse non spécifique est caractérisée par la libération d'hormones interagissant avec de multiples processus physiologiques et métaboliques qui permettent à l'organisme d'affronter le facteur de stress et de récupérer après son exposition (Hontela, 1997). La réponse au stress comporte deux éléments. Il y a la réponse rapide qui se manifeste par l'activation du système nerveux sympathique. L'activation de ce système permet la libération de catécholamines (épinéphrine et norépinéphrine) dans la circulation sanguine à partir de la médulla surrénale (cellules chromaffines pour les vertébrés inférieurs) et des bourgeons terminaux sympathiques. Les catécholamines agissent par les mécanismes β -adrénergiques. Elles agissent au niveau du système cardiorespiratoire et augmentent la capacité du transport de l'oxygène dans le sang et la mobilisation des substrats énergétiques (Hontela, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Chez le poisson, la réponse lente implique l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal (HHI). Suite à son activation par le facteur de stress, cette réponse prend naissance dans l'hypothalamus qui libère alors le facteur de libération des corticotropines (CRH). Celui-ci agit sur l'hypophyse qui sécrète à son tour l'adrénocorticotropine (ACTH) dans la circulation sanguine. L'ACTH stimule la synthèse et la sécrétion de corticostéroïdes (cortisol ou corticostérone selon l'espèce) dans la circulation sanguine, par le cortex surrénal (tissu interrénal pour les vertébrés inférieurs) (Hontela, 1997; Wendelaar Bonga, 1997). Le cortisol est synthétisé à partir du cholestérol tout comme les autres stéroïdes : la testostérone, l'œstradiol et l'aldostérone (minéralocorticoïde présent chez les mammifères) (Voet et Voet, 1998). La biosynthèse du cortisol chez les poissons est similaire à celle des mammifères. Ainsi, la liaison de l'ACTH sur les récepteurs des cellules interrénales active l'adénylate cyclase. Celle-ci génère de l'AMPc et il s'en suit une activation des protéines kinases qui stimulent la synthèse du cortisol par l'activité de plusieurs enzymes. Premièrement, le cholestérol est transféré dans la membrane mitochondriale interne par la protéine StAR (venant de l'anglais : *Steroidogenic Acute Regulatory protein*) (Jefcoate, 2002). Dans la mitochondrie, le cholestérol est alors transformé en prégnénolone par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (P-450_{scc}). Ensuite, transférée dans le réticulum endoplasmique, elle est

hydroxylée par la stéroïde C17 hydroxylase (P-450 17 α) suivi de la C21 hydroxylase (P-450 C21) générant le 11-déoxycortisol. Cette molécule retourne ensuite dans la mitochondrie où elle est hydroxylée par la 11 β -hydroxylase (P-450 11 β), menant à la synthèse du cortisol (Klaassen, 1996; Hontela, 1997). Le cortisol diffuse au travers de la membrane des cellules interrénales et est libéré dans la circulation sanguine.

L'effet du cortisol sur le tissu cible est régulé par plusieurs facteurs, dont l'abondance des protéines de transport du cortisol et des récepteurs cortisoliques des tissus cibles, l'affinité des récepteurs pour le cortisol et le métabolisme du cortisol. Chez le poisson, le cortisol est transporté sur une protéine appelée « glucocorticoid-binding protein » (Hontela, 1997; Breuner et Orchinik, 2002). Bien que cette liaison permette un certain emmagasinage de l'hormone, elle diminue la quantité de cortisol libre (biologiquement actif) pouvant se fixer aux récepteurs des tissus cibles (Breuner et Orchinik, 2002). Par sa nature lipophile, le cortisol libre diffuse dans les cellules cibles et se lie aux récepteurs protéiques spécifiques présents dans le cytosol ou dans le noyau (Mommsen *et al.*, 1999). Les récepteurs du cortisol sont présents dans les branchies, les intestins, le foie (Chakraborti *et al.*, 1987; Wendelaar Bonga, 1997) et le cerveau (Carruth *et al.*, 2000). Ces récepteurs s'autorégulent (Mommsen *et al.*, 1999; Breuner et Orchinik, 2002), c'est-à-dire qu'une stimulation prolongée des récepteurs induit une réduction de leur abondance. L'abondance de récepteurs exprimés au niveau de ces tissus cibles détermine donc, en partie, l'importance de la réponse au stress apportée par le cortisol (Pottinger *et al.*, 2000). De plus, l'affinité des récepteurs pour le cortisol nécessite la participation de protéines de choc thermique (HSP). En effet, grâce au changement de conformation des récepteurs de cortisol, les HSP augmentent l'affinité des récepteurs cortisoliques pour le cortisol (Marsigliante *et al.*, 2000). Le complexe récepteur-cortisol est par la suite transféré dans le noyau, où il procure une action génomique. Finalement, une augmentation de la clairance du cortisol (Breuner et Orchinik, 2002) et la boucle de rétroaction négative sur les cellules corticotropes (celles qui libèrent l'ACTH) et sur l'interrénale par le cortisol (Bradford *et al.*, 1992) diminuent la concentration de cortisol plasmatique et par le fait même, son action. Comme mentionné ci-haut le cortisol a un rôle important dans le processus de l'homéostasie. Les facteurs de stress induisent chez le poisson une perturbation hydrominérale qui nécessite une osmorégulation et une mobilisation des

réserves énergétiques afin de permettre la récupération de l'équilibre normal (Wendelaar Bonga, 1997). Cette perturbation hydrominérale chez le poisson téléosté se manifeste par une diminution de ses électrolytes plasmatiques (sodium et chlorure). Après avoir induit un stress de confinement d'une durée de 330 min chez la truite brune (*Salmo trutta*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), celles-ci démontraient une diminution plasmatique des électrolytes comparativement aux témoins non stressés (Ruane *et al.*, 1999). Le cortisol participe à l'osmorégulation en stimulant la prolifération de cellules à chlorures dans les branchies (cellules principales pour le transport ionique) et en stimulant l'activité Na^+/K^+ -ATPase des branchies (Evans, 2002; Mancera *et al.*, 2002). La Na^+/K^+ -ATPase crée le gradient pour le transport des ions monovalents. Son activité permet, chez le poisson d'eau douce, l'entrée d'ions Na^+ et par conséquent, le maintien de l'osmolalité (Hontela, 1997). Le cortisol participe aussi au métabolisme énergétique par l'activation d'enzymes dans le métabolisme intermédiaire hépatique (Hontela, 1997). En effet, le cortisol stimule la glycogénolyse et la gluconéogénèse depuis les sources protéiques et lipidiques (Wendelaar Bonga, 1997). De plus, Vijayan *et al.* (1994) ont montré que le cortisol augmentait l'oxydation de l'alanine et la gluconéogénèse dans les hépatocytes de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Il en résulte une élévation de la glycémie (Vijayan *et al.*, 1991). Cette mobilisation des réserves énergétiques permet l'utilisation du glucose nécessaire aux métabolismes impliqués dans les processus homéostasiques (Ruane *et al.*, 1999).

Les perturbateurs endocriniens et les effets sur la réponse au stress

Telle qu'il a été expliqué précédemment, la réponse au stress nécessite l'intégrité fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal. Or, certaines substances toxiques, notamment les perturbateurs endocriniens (PE) ont la capacité d'interférer quelque part dans cet axe qui normalement permet de hausser le cortisol plasmatique en réponse au facteur de stress. Il en résulte alors une défaillance cortisolique. Plusieurs recherches ont mis en évidence des cas de défaillance cortisolique, chez le poisson, associés à la présence de perturbateurs endocriniens dans leur habitat. Ceci a été observé chez des perchaudes provenant d'un milieu contaminé au cadmium, cuivre, fer et zinc (Brodeur *et al.*, 1997), chez des grands brochets (*Esox lucius*) provenant d'un milieu contaminé au mercure (Lockhart *et al.*, 1972), chez le meunier noir (*Catostomus commersoni*), la perchaude et le grand brochet

provenant d'un site pollué par des effluents de pâtes et papiers (McMaster *et al.*, 1994; Hontela *et al.*, 1997), et la perchaude et le grand brochet provenant de sites pollués par un mélange de polluants organiques et métaux lourds (Hontela *et al.*, 1992; Hontela *et al.*, 1995; Girard *et al.*, 1998). Dorval *et al.* (2005) ont récemment montré une diminution de cortisol plasmatique chez le meunier noir capturé dans la rivière Yamaska où sont détectés des pesticides tels que l'atrazine et le métolachlore.

Les perturbateurs endocriniens ont plusieurs sites d'action potentiels dans la voie de synthèse du cortisol. Par exemple, certains peuvent affecter l'action d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'hormone. Le diméthoate et le lindane (insecticides) inhibent l'activité d'une enzyme clef dans la stéroïdogénèse, la protéine StAR, responsable du transfert du cholestérol dans la mitochondrie (Yamazaki *et al.*, 2005). En conséquence de son inhibition, il y a une diminution dose-dépendante de la synthèse du cortisol. Le tributylétain (peinture antisalissure biocide), inhibe la transcription d'enzymes du cytochrome P450 spécifiques dans la synthèse du cortisol (P450 11 β et P450 C21) (voir la synthèse du cortisol précédemment expliquée) (Yamazaki *et al.*, 2005). Certains PE perturbent la synthèse du cortisol par induction du stress oxydatif dans la cellule stéroïdogénique, comme il a été démontré avec l'insecticide endosulfane (Dorval *et al.*, 2003). D'autres PE peuvent imiter l'effet des hormones naturelles (agonistes) ou en bloquer l'action (antagonistes) par des interactions au niveau du récepteur de l'hormone, ce qui peut affecter l'effet de l'hormone et engendrer une perturbation dans la rétroaction des contrôles supérieurs (hypothalamus, hypophyse) (Jobling et Tyler, 2003). Enfin, plusieurs autres mécanismes tels que l'inhibition de la rétroaction négative ou son activation, l'interférence avec la régulation du nombre de récepteurs hormonaux et l'augmentation du métabolisme et de la clairance du cortisol peuvent modifier le niveau de l'hormone en circulation (Klaassen, 1996).

Afin d'évaluer le potentiel de perturbateur endocrinien que peut avoir une substance et d'étudier le mécanisme intracellulaire par lequel la défaillance cortisolique est causée, notre laboratoire a mis au point un bioessai *in vitro* utilisant des cellules interrénales (lieu de synthèse du cortisol) provenant de la truite arc-en-ciel (Leblond et Hontela, 1999). Les cellules interrénales sont exposées *in vitro* à la substance toxique selon plusieurs

concentrations et elles sont par la suite soumises à l'ACTH afin de stimuler la sécrétion cortisolique. Le cortisol libéré est ensuite dosé et parallèlement, la viabilité cellulaire est évaluée. A l'aide d'une courbe dose-réponse, la concentration de la substance toxique qui diminue la concentration en cortisol de 50 % (CE50) est comparée à celle qui diminue la viabilité cellulaire de 50 % des cellules (CL50). Le perturbateur endocrinien est reconnu par sa CE50 plus faible que sa CL50. Ainsi, cela permet de savoir si la diminution de cortisol résulte d'une perturbation dans la voie de synthèse et de sécrétion, ou bien d'une toxicité cellulaire. De plus, lorsqu'une perturbation endocrinienne est démontrée par le test *in vitro*, il est possible d'évaluer les cibles intracellulaires de la voie signalétique menant à la synthèse et à la sécrétion du cortisol. Ce bioessai a permis de démontrer que certains pesticides, notamment l'*o,p'*-DDD et l'endosulfane, avaient un potentiel de PE et qu'ils pouvaient interférer avec la voie de synthèse normale du cortisol à l'intérieur même des cellules interrénales de téléostéens (Leblond *et al.*, 2001; Bisson et Hontela, 2002; Dorval *et al.*, 2003; Lacroix et Hontela, 2003).

L'activité Na^+/K^+ -ATPase des branchies

L'activation de l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase des branchies fait parti des innombrables rôles fondamentaux de l'hormone cortisol. Avec la participation des hormones thyroïdiennes, le cortisol stimule son activité, permettant ainsi le contrôle de l'osmolarité plasmatique (Evans, 2002). Cet activation permet d'augmenter la tolérance à la salinité pour les poissons catadromes (Madsen *et al.*, 1995). Elle peut aussi être activée en eau douce par le cortisol (Kelly et Wood, 2001). Dans l'environnement hypoosmotique de l'eau douce, l'équilibre ionique interne est maintenu par l'absorption de Na^+ et de Cl^- du milieu externe qui est très dilué (Evans *et al.*, 2005). Le rôle de transfert gazeux et d'osmorégulation des branchies nécessite un contact étroit avec l'environnement dans lequel baigne le poisson. Les branchies sont donc modifiées pour maximiser la surface de contact disponible pour les échanges gazeux, minimiser la distance de diffusion entre le milieu interne et externe, et maximiser la perfusion du tissu (Evans *et al.*, 1999). L'enzyme Na^+/K^+ -ATPase présente dans les cellules à chlorures de l'épithélium branchial est par conséquent une cible vulnérable aux contaminants environnementaux. Plusieurs études ont montré une diminution de son activité suite à une exposition à des contaminants tels que certains métaux et pesticides (Lévesque *et*

al., 2003; Sancho *et al.*, 2003; Waring et Moore, 2004). L'analyse de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase permettra d'évaluer l'effet du métolachlore et de l'ensemble des contaminants agricoles sur cette enzyme.

Le glucose plasmatique et le glycogène hépatique

Le métabolisme des glucides est aussi sous contrôle du cortisol (Mommsen *et al.*, 1999). Le cortisol permet de favoriser la libération de glucose à partir du foie, afin de libérer l'énergie nécessaire aux processus impliqués dans l'homéostasie (Mommsen *et al.*, 1999). Le glucose plasmatique augmente et diminue respectivement avec une hausse ou une baisse de cortisol plasmatique (Lockhart *et al.*, 1972; Bleau *et al.*, 1996). Le glycogène hépatique est une mesure qui permet d'estimer les réserves énergétiques des poissons. A court terme, le cortisol augmente l'activité de la glycogène synthétase, le dépôt de glycogène dans le foie et l'inhibition de la glycogénolyse. Les réserves en glycogène sont donc augmentées. Celui-ci est un substrat facilement mobilisable par les hormones qui régulent la glycémie. Cependant, des études ont montré une diminution du glycogène hépatique associée à l'exposition chronique à plusieurs contaminants dont le mercure, le cadmium ainsi que plusieurs pesticides (Dange, 1986; Bleau *et al.*, 1996; Ricard *et al.*, 1998; Lévesque *et al.*, 2003; de Aguiar *et al.*, 2004).

L'activité des acétylcholinestérases

L'activité des enzymes acétylcholinestérases est un biomarqueur d'exposition aux pesticides organophosphorés et carbamates utilisé depuis plus de 20 ans en biosurveillance environnementale (Davies *et al.*, 1994; Walker, 1996; Thompson, 1999). Il est utilisé chez les mammifères, mais aussi les oiseaux et les poissons. Les pesticides organophosphorés et carbamates inhibent les acétylcholinestérases (Thompson, 1999). Ces enzymes se retrouvent dans les tissus du système nerveux ainsi que dans le cerveau, les globules rouges et le plasma de plusieurs vertébrés. Elles sont impliquées dans le mécanisme de la transmission de l'influx nerveux dans l'organisme. L'influx nerveux est propagé entre les cellules par la libération du neurotransmetteur acétylcholine dans les fentes synaptiques des jonctions interneuronales et neuromusculaires. La propagation de l'influx se termine par l'action des acétylcholinestérases. En effet, celles-ci hydrolysent les esters de l'acétylcholine, qui se

retrouve dégradée en choline et en acide acétique, ce qui met fin à l'influx nerveux (Klaassen, 1996). Conséquemment, l'inhibition des acétylcholinestérases par un pesticide entraîne une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique. Il en résulte un prolongement de l'influx nerveux provoquant une stimulation excessive pouvant même atteindre le tétanos et la mort de l'organisme. Les travaux de Dorval *et al.* (2005) ont montré une diminution de l'activité des acétylcholinestérases plasmatiques chez le meunier noir (*Catostomus commersoni*) échantillonné dans la rivière Yamaska, une rivière contaminée par les pesticides agricoles. Ce qui suppose que ces poissons sont exposés à un ou des agents anti-cholinestérases susceptibles d'être des pesticides organophosphorés ou carbamates.

L'hématocrite

Contrairement aux mammifères, chez qui les cellules sanguines proviennent de la moelle osseuse, les poissons téléostéens les produisent dans le tissu hématopoïétique situé dans la rate et le rein. Les composants hématologiques varient en réponse aux stress environnementaux. Comme chez les autres vertébrés, un stress interne ou environnemental produit une réduction des leucocytes en réponse aux corticostéroïdes dont fait partie le cortisol (Heath, 1995). C'est pourquoi lors d'un stress de pollution les poissons sont plus vulnérables aux maladies. Quant aux érythrocytes, leur compte peut varier à la hausse ou à la baisse avec la saison, l'exposition à certains stress environnementaux chimiques ou physiques comme le stress de capture, mais aussi à une perte ou un gain hydrique dans le sang (Heath, 1995). Une diminution du compte érythrocytaire a été observée chez la truite arc-en-ciel exposée au cadmium durant 181 jours. Cette diminution était attribuée à une tendance à la lyse cellulaire (anémie hémolytique) causée par la fragilité membranaire. Une stimulation de la défense des antioxydants a montré que la cause de la lyse cellulaire était due à la peroxydation lipidique membranaire (Palace *et al.*, 1993). D'autres contaminants chimiques comme certains pesticides organochlorés et le fongicide chlorothalonil causent aussi certains degrés d'anémie chez le poisson (Heath, 1995). Au contraire, certains pesticides organiques tels l'aldrine et le chlordane stimulent l'érythropoïèse (Dhillon et Gupta, 1983). Bien que l'exposition à certains contaminants cause une anémie par diminution réelle du nombre d'érythrocytes, une dysfonction au niveau de l'osmorégulation peut aussi causer une anémie apparente, ou son opposé, sans toutefois qu'il y ait de perturbation du système hématopoïétique.

Conséquemment, il est important de mesurer aussi les électrolytes, l'osmolarité et/ou la concentration des protéines plasmatiques chez le poisson. Il y a généralement une bonne corrélation entre l'hématocrite, la concentration en hémoglobine et le compte cellulaire des érythrocytes (Heath, 1995). Le métolachlore se fixe largement aux globules rouges et peut mener à l'anémie (U.S. EPA, 2001). L'hématocrite a été utilisé dans l'étude en milieu contrôlé afin d'évaluer l'effet du métolachlore sur ce paramètre chez le poisson.

Le facteur de condition et l'indice hépatosomatique

Le facteur de condition (relation entre le poids et la longueur du poisson) est un indice de l'état de santé du poisson et un indicateur de croissance (Dutta, 1994). Plusieurs facteurs environnementaux peuvent l'affecter; les stressseurs, les changements nutritifs, la localisation géographique, etc. (Goede et Barton, 1990). Malgré tout, le facteur de condition est fréquemment utilisé en écotoxicologie car il tend souvent à diminuer avec une contamination du milieu. Lévesque *et al.* (2003) ainsi que Laflamme *et al.* (2000) ont montré que des poissons vivant dans un site contaminé en métaux avaient un facteur de condition plus faible que ceux échantillonnés dans un site non contaminé. Mickaelian *et al.* (2002) ont aussi remarqué une diminution du facteur de condition avec la contamination chez les corégones (*Coregonus clupeaformis*) du Fleuve Saint-Laurent. L'indice hépatosomatique, un ratio entre le poids du foie sur le poids corporel, est aussi utilisé dans plusieurs études reliées au stress. En situation de stress chronique, une diminution de l'indice est souvent notée et est fréquemment liée à une diminution des réserves énergétiques de glycogène dans le foie (Goede et Barton, 1990; Roman et Dixon, 1996). Ricard *et al.* (1998) ont noté de tels résultats lors d'une exposition chronique au chlorure de cadmium chez la truite arc-en-ciel. Paradoxalement, certaines formes de contamination peuvent aussi faire augmenter l'indice hépatosomatique. L'augmentation du poids du foie serait alors attribuable à l'hyperplasie et à l'hypertrophie des cellules hépatiques, une réponse adaptative permettant d'augmenter la capacité de détoxification du foie (Heath, 1995).

OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Objectifs de recherche

L'objectif général de ce projet de maîtrise était d'évaluer le statut physiologique du poisson d'eau douce exposé de façon chronique aux pesticides et autres polluants agricoles. Le premier sous-objectif était de caractériser, par une étude réalisée en laboratoire, les effets d'une exposition chronique au métolachlore sur le statut physiologique de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Le second sous-objectif était de caractériser, par une étude effectuée en milieu naturel (rivière Yamaska, Qc), les effets d'une exposition chronique à plusieurs pesticides et autres polluants agricoles sur le statut physiologique de la perchaude (*Perca flavescens*).

Le potentiel de perturbation endocrinienne du métolachlore ou des polluants agricoles sur l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal (HHI) a été évalué, puisque plusieurs types de polluants environnementaux peuvent affecter cet axe et inhiber la réponse au stress, par épuisement de l'axe causé par un stress chronique ou action toxique sur le système HHI (Hontela, 1998; Benguira *et al.*, 2002).

Hypothèses expérimentales

- Advenant l'exposition (en laboratoire ou en milieu naturel) à un perturbateur endocrinien de l'axe HHI, la réponse au stress (libération du cortisol) chez le poisson sera affaiblie. De plus, dans le bioessai *in vitro* (effectué en laboratoire seulement) dans lequel des cellules interrénales de truite arc-en-ciel sont exposées au métolachlore puis soumises à l'ACTH, la concentration de métolachlore diminuant la sécrétion cortisolique de 50 % (CE50) sera plus faible que celle qui tue 50 % des cellules (CL50); une réponse semblable à celle obtenue avec le même bioessai et d'autres pesticides perturbateurs de l'axe HHI (Leblond *et al.*, 2001; Bisson et Hontela, 2002).
- Vu la vulnérabilité de l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase des branchies à plusieurs types de contaminants tels que les métaux et les pesticides, l'activité de cette enzyme sera plus faible dans le milieu le plus contaminé (Sancho *et al.*, 2003; Waring *et al.*, 2004).

- Comme le glucose sanguin est relié au cortisol plasmatique, il diminuera avec la baisse de cortisol plasmatique (Lockhart *et al.*, 1972; Bleau *et al.*, 1996).
- Le glycogène hépatique, réserve énergétique, diminuera avec la concentration en métolachlore pour l'étude laboratoire et sera plus faible pour les poissons exposés aux polluants agricoles en milieu naturel, puisque le glycogène hépatique diminue suite à l'exposition chronique aux contaminants (Dange, 1986; Bleau *et al.*, 1996; Ricard *et al.*, 1998; Lévesque *et al.*, 2003; de Aguiar *et al.*, 2004).
- L'activité des cholinestérases plasmatiques ne devrait pas être affectée par l'exposition au métolachlore puisque cet herbicide n'est pas un inhibiteur des cholinestérases, toutefois une diminution est attendue dans le site contaminé par les pesticides dans la rivière Yamaska, puisque des insecticides organophosphorés y sont détectés (Delisle, 1998).
- Une diminution de l'hématocrite est attendue avec l'exposition au métolachlore en laboratoire puisque cet herbicide se lie aux globules rouges et peut causer une anémie (U.S. EPA, 2001). L'hématocrite n'a pas été utilisé pour l'étude en milieu naturel.
- L'indice hépatosomatique diminuera avec la diminution des réserves de glycogène hépatique puisque les deux sont reliés (Goede et Barton, 1990; Roman et Dixon, 1996).
- Comme la condition du poisson est négativement affectée avec la contamination environnementale (Laflamme *et al.* 2000), le facteur de condition sera plus faible suite à l'exposition chronique au métolachlore ou aux polluants agricoles.

Cette étude est une des premières à évaluer les effets du métolachlore sur le statut physiologique du poisson d'eau douce. De plus, l'approche utilisant une gamme de biomarqueurs reliés à plusieurs fonctions physiologiques différentes constitue une particularité intéressante du projet, en ce sens qu'elle permet de tracer un portrait général des cibles potentiellement affectées par le métolachlore ou l'ensemble des polluants agricoles.

CHAPITRE I

EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO METOLACHLOR ON THE PHYSIOLOGICAL STATUS OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

MARTINE CAMIRÉ, PHILIP SPEAR AND ALICE HONTELA

Article à soumettre

Mots clés: metolachlor, cortisol, endocrine disruptor, acetylcholinesterases activity, osmoregulation, hematocrit, glycogen, rainbow trout

1.1 ABSTRACT

Metolachlor, a herbicide commonly used in a variety of crops, is detected in many aquatic systems where organisms are chronically exposed to this chemical. The aim of the present laboratory study was to identify the potential targets of metolachlor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Metolachlor has been evaluated for its endocrine disrupting potential *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* bioassay results showed that metolachlor has a potential to be an endocrine disruptor when applied directly on interrenal cells. In contrast, *in vivo* metolachlor exposure during 30 days did not demonstrate endocrine disruption of the HPI axis. However, low metolachlor exposure (200 µg/L) increased hematocrit while high concentration (800 µg/L) caused anaemia. Metolachlor did not affect the plasma acetylcholinesterase activity. Major effects were detected at 800 µg/L metolachlor and were linked to internal ionic perturbation possibly attributed to ion loss: exacerbated stress response (in term of plasma cortisol) and enhancement of gill Na⁺/K⁺-ATPase. Decreased hepatic glycogen reserves and hepatosomatic index were also detected in exposed fish. Our results indicate that metolachlor is not an endocrine disruptor but that it targets blood components at low water concentrations, and internal ionic balance and energetic status at higher concentration. Further studies are needed to fully assess blood functions with low metolachlor concentration, with a special attention to antioxidant defences mechanisms.

1.2 INTRODUCTION

Metolachlor, 2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-ethylethyl)-acetamide, is a herbicide from the chloroacetanilide family. Seedling shoot and root inhibition is the common mechanism of action of this group of herbicides (Peterson *et al.*, 2001). Metolachlor was first registered in 1976 for general weed control in non-crop areas, it is now used to control select annual grasses and broadleaf weeds in a variety of crops including corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*), bean (*Phaseolus vulgaris*) and potato (*Solanum tuberosum*). Over the last 25 years, metolachlor has gained worldwide popularity. Now registered in many parts of the world, it is commonly used in Canada and United States (Clark and Goolsby, 2000; Giroux, 2002; Takacs *et al.*, 2002; Orme and Kegley, 2004).

Metolachlor is currently ubiquitous in the environment, particularly in aquatic media. This contamination is a consequence of its high water solubility and mobility, as well as its long degradation time (Rivard, 2003). At 20 °C, the time it takes for 50 % of the applied concentration of the pesticide to be broken down by hydrolysis (DT50) is over 200 days (Worthing and Walker, 1987). Studies conducted on agricultural watershed revealed contamination of streams and lakes by this herbicide during summer months, or longer in tropical countries (Battaglin *et al.*, 2000; Clark and Goolsby, 2000; Scribner *et al.*, 2000; Giroux, 2002; Giroux, 2003; Osano *et al.*, 2003; Rivard, 2003). Environmental concentrations can reach up to 143 µg/L in Midwestern United States (Battaglin *et al.*, 2000).

Aquatic organisms may be chronically exposed to metolachlor, yet data on chronic effects in fish are scarce (Takacs *et al.*, 2002). Acute toxicity tests have identified the median lethal concentration (LC50) for many fish species, including rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), for which the LC50 96 hours is 2-3.9 mg/L (Worthing and Walker, 1987; Orme and Kegley, 2004). The acute toxicity tests identified metolachlor as moderately toxic to freshwater fish (U.S. EPA, 1995). At this time, only one chronic toxicity test has been reported, with reproduction impairment as the primary endpoint. Fathead minnows (*Pimephales promelas*) were exposed for a 34-day period, and the No Observed Effect Level

4-d NOEL) was identified as 780 µg/L (Cruz *et al.*, 1993). However, well before reproduction impairment or death occurs in a fish population, important modifications at a lower level of organisation have the potential to occur, notably at the hormonal as well as cellular and biochemical levels (Barton and Iwama, 1991; Bonga, 1997; Barton, 2002). These responses may be part of an adaptation to the stressor and thus confer a survival advantage to the fish. The continued influence of the stressor, or higher exposure to the stressor, may cause detrimental effects with consequences at the population level.

Among these sublethal modifications, endocrine disruption, which has been reported in freshwater fish populations around the world, is of concern (Jobling, 2003). Endocrine-disrupting chemicals (EDCs), i.e. chemicals that have the capacity to interfere with the endocrine system, may act at a number of different targets and affect a variety of physiological processes. Studies revealed that certain pesticides have the potential to interfere with the hypothalamo-pituitary-interrenal axis (HPI) of teleost fish and impair the stress response (Benguira *et al.*, 2002; Dorval *et al.*, 2003). In addition to potential endocrine disruption, pesticide exposures have been found to affect several functions of fish physiology. For example, gill Na⁺/K⁺-ATPase activity, an integral part of osmoregulation, is impaired by the organochlorine insecticides DDT and chlordane, the triazine herbicide atrazine and the carbamate herbicide thiobencarb (Murty, 1986; Heath, 1995; Sancho *et al.*, 2003; Waring and Moore, 2004). Haematological function has been reported to be impaired by the organochlorine insecticide endosulfan and the organophosphorus insecticide phosphamidon. These two insecticides cause anaemia, which is partly revealed by a decrease of the hematocrit (Gill *et al.*, 1991; Davies *et al.*, 1994; Barton, 2002). The nervous system is one important target of carbamate and organophosphorous insecticides. These insecticides have the potential to inhibit acetylcholinesterases which are essential for the regulation of nerve impulse (Murty, 1986; Pavlov *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1994; Thompson, 1999; Jarrard *et al.*, 2004; Scott and Sloman, 2004). A decrease in the energetic reserves often results from pesticide exposures. The organophosphorus pesticide methyl parathion, the herbicide 2,4-Diamin and many others, have been shown to decrease liver glycogen content and plasma glucose (Mukhopadhyay and Dehadrai, 1980; Dange, 1986; Davies *et al.*, 1994; Oruc and Uner, 1999; de Aguiar *et al.*, 2004). In addition, pesticide exposure also induces changes in

physical indices such as the ratio of liver to body weight (hepatosomatic index, HSI) and the body length-mass relationship (condition factor) (Davies *et al.*, 1994; Heath, 1995). A decrease in HSI is frequently detected in fish under chronic stress situations and HSI is often correlated with decreased energy stores such as liver glycogen (Heath, 1995). Alternatively, an increase in HSI may occur in fish chronically exposed to organic contaminants (Vignier *et al.*, 1992; Hontela *et al.*, 1995). This could be attributed to hyperplasia (increase in cell number) and/or hypertrophy (increase in cell size) of the hepatocytes, possibly associated with increased capacity to metabolize xenobiotics (Heath, 1995). Finally, pesticides and other contaminants can potentially reduce growth and lower the condition factor (Hontela *et al.*, 1995), although, some pesticides have the potential to stimulate growth at very low concentration (Niimi and McFadden, 1982; Murty, 1986).

The present study was undertaken to evaluate the effects of metolachlor exposure on HPI axis and the physiological status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The HPI axis was assessed by an interrenal cell bioassay following *in vitro* exposure. In addition, the stress response was evaluated *in vivo* on the basis of plasma cortisol concentrations. Other physiological parameters associated with biological functions were gill Na^+/K^+ -ATPase activity, hematocrit, plasma acetylcholinesterase activity, plasma glucose, hepatic glycogen, hepatosomatic index and condition factor.

1.3 MATERIALS AND METHODS

1.3.1 EXPERIMENTAL ANIMALS

Juvenile (40-60g) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were purchased from the Pisciculture Laurentienne, Labelle, Québec. Fish were acclimated 3 weeks in 600 L flow-through tanks (1L/min) at $15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, photoperiod 12L:12D, oxygen-saturated water, hardness of 70 mg/l CaCO_3 and pH 7.2. They were fed daily with a commercial trout chow (Purina Trout Chow) at 1.8 % of body weight.

1.3.2 METOLACHLOR EXPOSURE *IN VITRO*

1.3.2.1 Preparation of interrenal cell suspension

Interrenal cell suspensions were prepared as described by Leblond and Hontela (1999). After anaesthesia in MS-222, fish were bled from the caudal vasculature and perfused with 20 ml of saline 0.7 %, to remove as many blood cells as possible. The head kidney was dissected and washed twice in minimal essential medium (MEM) with bovine serum albumin (BSA) supplement. The tissue was then transferred into MEM-BSA containing 2.0 mg/ml of collagenase/dispase and incubated with gentle agitation for 60 min. at room temperature to obtain individual cells. Following this enzymatic digestion, the solution was filtered with a 30 μm mesh cloth and the filtrate was centrifuged at 300 g for 5 min. The pellet was resuspended in MEM-BSA to obtain a cell suspension of 75×10^6 cells / ml.

1.3.2.2 Exposure of interrenal cells to metolachlor

Interrenal cells were placed in a 96-well microplate at 150 μl of 75×10^6 cells/ml and incubated 60 min at 15°C with gentle agitation. After centrifugation of the microplate (1000 rpm, 3 min.), the cells were resuspended in 150 μl of Ringer solution containing 5 % of dimethyl sulfoxide (DMSO) (control) or DMSO+Metolachlor (CAS no.: 51218-45-2, purity of 96.3%, purchased from Chem Service, West Chester, PA) at a final concentration in wells of 5×10^{-3} to 5×10^{-9} mg/L, and incubated for 60 min. After centrifugation, the cells were washed with 200 μl of Ringers physiological buffer, centrifuged and resuspended in MEM-BSA containing 1U/ml of ACTH to stimulate cortisol secretion for 60 min at 15°C . The

supernatants were used to determine cortisol secretion. Cell viability was evaluated by flow cytometry using a FAC-scan (Becton Dickinson) equipped with an argon laser emitting at 488 nm. To perform the viability test, 5 μ l sampled from each well of the microplate were resuspended in 370 μ l of MEM to which the exclusion dye propidium iodide (PI 1 μ g/ml) was added. Each metolachlor concentration was tested on interrenal cell suspensions prepared from individual fish (n=5 to 13 individual fish).

1.3.3 METOLACHLOR EXPOSURE *IN VIVO*

Four groups of 30 fish were exposed during 30 days to metolachlor (S-Metolachlor and R-enantiomer, Dual II Magnum 915g/L ®) obtained from Novartis Crop Protection, Canada Inc. by Marriott bottles, as described by Grenier (1960). Marriott bottles were delivering constantly the test pesticide (metolachlor solution) or water (control) in 4 different 600 L flow-through tanks (1L/min) at $15^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, photoperiod 12L:12D, oxygen-saturated water, hardness of 70 mg/l CaCO_3 and pH 7.2. Metolachlor concentrations in tanks water were 0, 200, 500 and 800 $\mu\text{g/L}$, representing 0, 10, 25 and 40 % of the LC50 96 hours (2 mg/L) for rainbow trout (Kent *et al.*, 1991). During the exposure, fish were fed at 1.8 % of body weight. Food consumption was evaluated by counting the number of uneaten pellets one hour after food was presented to the fish. Body weights and water samples were taken weekly.

1.3.3.1 Pesticide analysis

Water samples (200 ml) were frozen until analysis. Metolachlor was extracted by filtration on octadecyl cartridge (C-18). The analyte was eluted with ethyl acetate and the solvent evaporated under nitrogen gas. Final metolachlor concentration was determined by GC-MS with a detection limit of 0.03 $\mu\text{g/L}$ (Perkin-Elmer).

1.3.3.2 Sampling

On day 30 of the metolachlor exposure, fish were subjected to a standardized stress challenge to assess their capacity to generate the normal cortisol stress response. They were caught with a net, held in the net above water for 15 seconds and placed back into the tank. The procedure was done at 0930 hrs to minimize the effects of diurnal fluctuations in plasma cortisol. Forty-

five minutes after the stress challenge, fish were anaesthetized by immersion in a solution of tricaine methanesulfonate (MS-222, 0.1 g l⁻¹ of water). Blood was withdrawn from the caudal vein with a heparinized syringe. A small aliquot of blood was used to determine the hematocrit and the remaining blood was centrifuged to obtain plasma (13 000 rpm, 5 min). Body weight and length were recorded and liver and gills were dissected. The plasma, liver and gills were frozen in liquid nitrogen. Hepatosomatic index was calculated by dividing liver weight by total weight (HSI= liver weight (g) / total weight (g) X 100) and the condition factor was calculated by dividing fish weight by length (total weight (g) / length (cm)³ X 100).

1.3.3.3 Biochemical analyses

Biomarkers were used to evaluate the physiological and hormonal status of the fish chronically exposed to metolachlor.

Plasma cortisol and glucose

Cortisol was determined with a radioimmunoassay kit (No. 07-221102 ICN Biomedicals Canada, Ltd, Montréal, Qc); plasma glucose was measured with a colorimetric enzymatic method (GOD-PAP, Boehringer Mannheim Diagnostica).

Plasma acetylcholinesterase (AChE) activity

The activity of AChE in plasma was determined using a modification of the technique described by Ellman *et al.* (1961) at 21 °C. The Tris/HCl buffer (0.1 M, pH 7.6), the selective butyrylcholinesterase inhibitor Iso-OMPA (0.1036 mM final concentration), the substrate acetylthiocholine iodide (AthCh; 0.4262 mM final concentration) and the dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB; 0.0704 mM final concentration) were purchased from Sigma. The TC-TROL ® normal human serum control was purchased from Teco diagnostic (Anaheim, California) and used as an inter-assay control. Briefly, 1200 µl of a Tris/HCl buffer + Iso-OMPA solution were added to 20 µl of fish plasma (or water for blanks). As described by Chuiko (2000), the selective butyrylcholinesterase inhibitor Iso-OMPA was used to inhibit the butyrylcholinesterase activity without inhibiting the AChE activity, to determine the real AChE activity. After 10 minutes of incubation at room temperature

(21°C), 100 µl of DTNB and 100 µl of AthCh were added to activate the enzymatic activity. Absorbance was read at 412 nm during 10 min in the kinetic mode, using a spectrometer - (Biochem 3200). AChE activity was expressed as µmol of substrate hydrolyzed per ml of plasma per hour.

Gill Na^+/K^+ -ATPase activity was measured with the method of Holliday (1985) and Morgan *et al.* (1997), with modifications described in Lévesque *et al.* (2003).

Hepatic glycogen was measured with a method described in Foster and Moon (1989) and Bleau *et al.* (1996).

1.4 STATISTICAL ANALYSIS

Biomarkers analyses were performed in duplicate or in triplicate while using microplate. Mean value of the replicates was respectively attributed to each fish. Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk and were \log_{10} -transformed when necessary to respect normality and homogeneity of variance. Statistical difference between control and treatments was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's test (alpha 0.05) from JMP IN 4 of SAS institute for both the *in vivo* and *in vitro* exposure. Results are presented as mean \pm SEM.

1.5 RESULTS

1.5.1 Metolachlor concentrations in treatment tank water during *in vivo* metolachlor exposure

Metolachlor concentrations in water of the exposure tanks (Table 1.1) were close to the nominal concentrations, confirming the efficacy of the Marriott bottle system to maintain a constant chemical exposure.

1.5.2 Effects of metolachlor exposure on HPI axis (*in vitro* and *in vivo* assessment)

In vitro exposure of the interrenal fish cells to metolachlor revealed a concentration-dependent effect on cortisol secretion and cell viability (Fig. 1.1.). The lowest significant effect on cortisol secretion (58 % of the control) was observed at a concentration of 71 mg/L metolachlor, without a significant reduction in viability (87 % of the control). The median effective concentration of metolachlor (EC₅₀, the concentration that inhibits ACTH-stimulated cortisol secretion by 50 %) and the median lethal concentration (LC₅₀, the concentration that kills 50 % of the cells) were respectively 79 mg/L and 1092 mg/L. Thus, in this bioassay, metolachlor impaired cortisol secretion at exposure level lower than those having a significant cytotoxic effect. Significant loss of cell viability was observed at 1419 mg/L of metolachlor, with 31 % of control viability.

A 30 day *in vivo* exposure of fish to metolachlor through water did not impair the cortisol stress response capacity. Metolachlor exposure up to 500 µg/L did not have a significant effect on stress response of rainbow trout (Fig. 1.2 A). When fish were exposed to 800 µg/L metolachlor, plasma cortisol increased significantly and was more than twice the plasma cortisol level of the control group (i.e. 45.8 ± 6.8 ng/ml versus $18.7 \text{ ng/ml} \pm 3.2$ for control group).

1.5.3 Effects of metolachlor exposure on the physiological status

Metolachlor exposure led to a concentration-dependent increase of the gill Na^+/K^+ -ATPase activity in fish (Fig. 1.2 B). The metolachlor treatments also affected blood parameters in two different ways. The group exposed to 200 $\mu\text{g/L}$ of metolachlor showed a significant increase in packed cell volume (hematocrit), however, at the highest concentration, a 7.4% significant decrease was observed (Fig. 1.2 C). The 30 day exposure to metolachlor did not affect the plasma acetylcholinesterase activity (Fig. 1.2 D). Metolachlor exposure did influence the metabolic status. Although the plasma glucose level did not differ between groups (Fig. 1.3 A), a significant decrease in liver glycogen was observed for the 800 $\mu\text{g/L}$ group (Fig. 1.3 B). In addition, this group also has a smaller liver weight as showed by the hepatosomatic index (Fig. 1.3 C). Finally, exposure to metolachlor did not have an effect on the condition factor, except for a small but significant decrease in the group exposed to 500 $\mu\text{g/L}$ of metolachlor (Fig. 1.4).

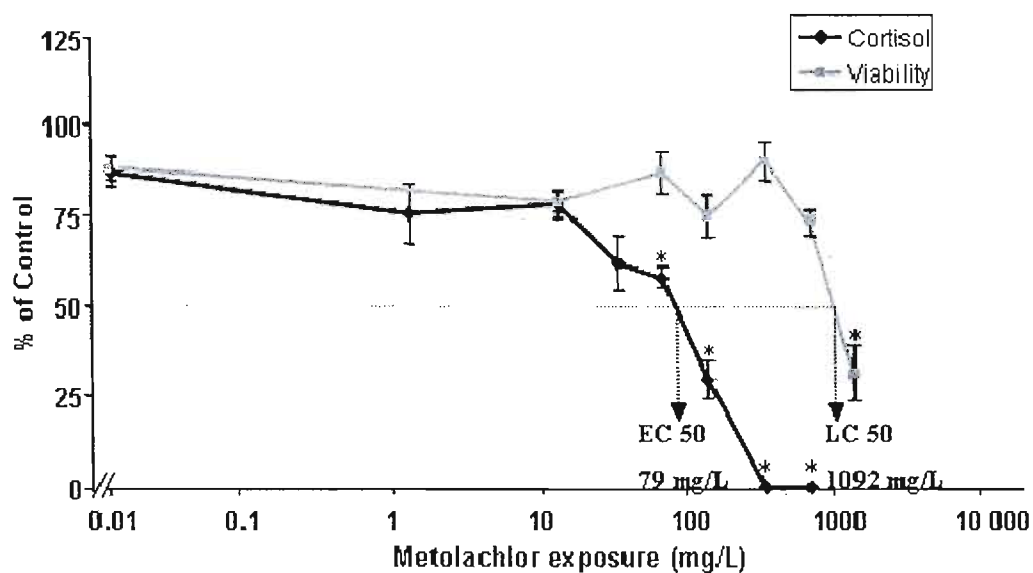


Fig 1.1 ACTH-stimulated cortisol secretion (◆) and cell viability (◻), expressed as percentage of controls (mean \pm SEM) of interrenal cells following 60 min *in vitro* exposure to metolachlor. * Significant difference from the control (not exposed to metolachlor). Statistical significance was evaluated by Dunnett's test ($p < 0.05$). The number of replicates is 5-14 for each concentration.

Table 1.1

Water metolachlor concentrations (mean \pm S.E.)^a in the four treatments of the *in vivo* metolachlor exposure

Nominal concentrations ($\mu\text{g/L}$)	Metolachlor ($\mu\text{g/L}$)
0 $\mu\text{g/L}$ (Control)	1.49 \pm 0.68 (N = 5)
200 $\mu\text{g/L}$	209 \pm 14.9 (N = 5)
500 $\mu\text{g/L}$	518 \pm 55.57 (N = 5)
800 $\mu\text{g/L}$	957 \pm 75.35 (N = 5)

^a Determined by gas chromatography, limit of detection = 0.03 $\mu\text{g/L}$

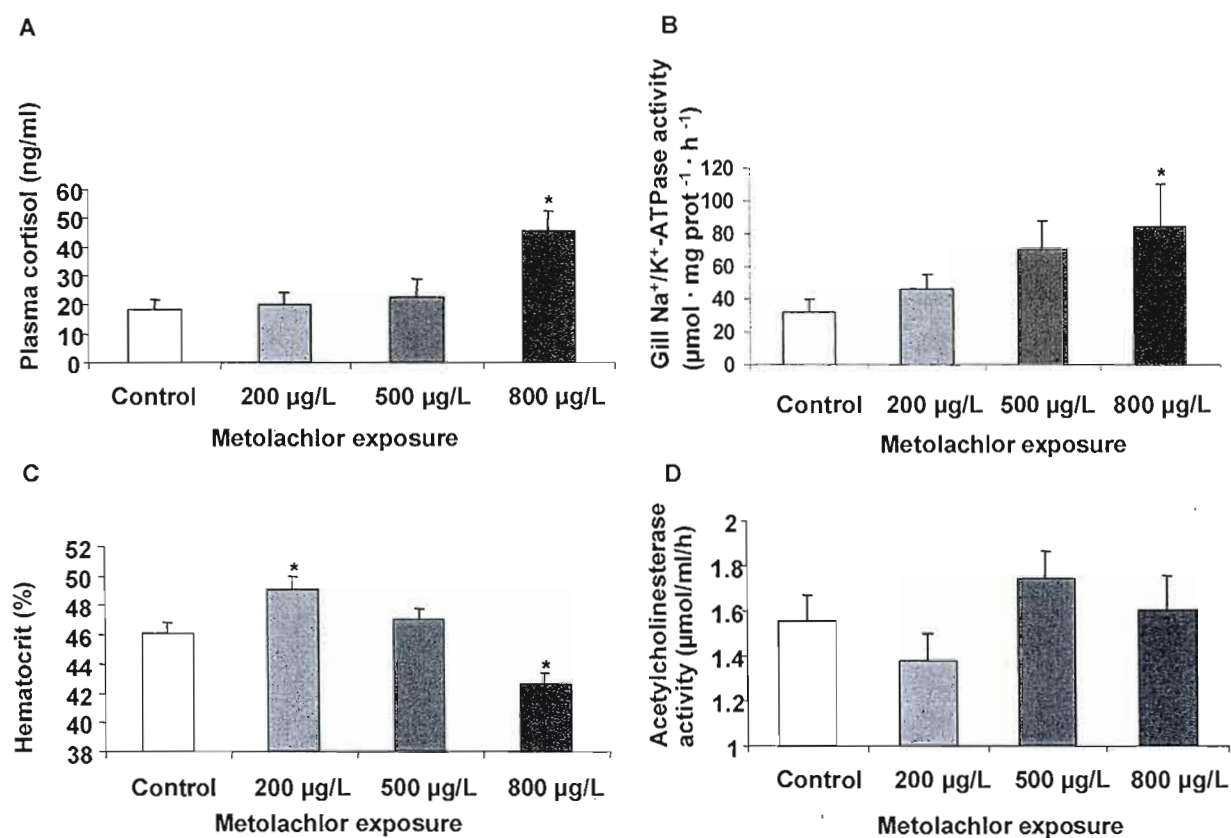


Fig.1.2 Plasma cortisol (A), gill Na^+/K^+ -ATPase activity (B), hematocrit (C) and plasma acetylcholinesterase activity (D) (mean \pm SEM) after a 30-day sublethal exposure of rainbow trout to 0, 200, 500 and 800 $\mu\text{g/L}$ of metolachlor. Number of fish sampled in each metolachlor concentration was 27. Means indicated by * are significantly different from the control (Dunnett's Test, $P < 0.05$).

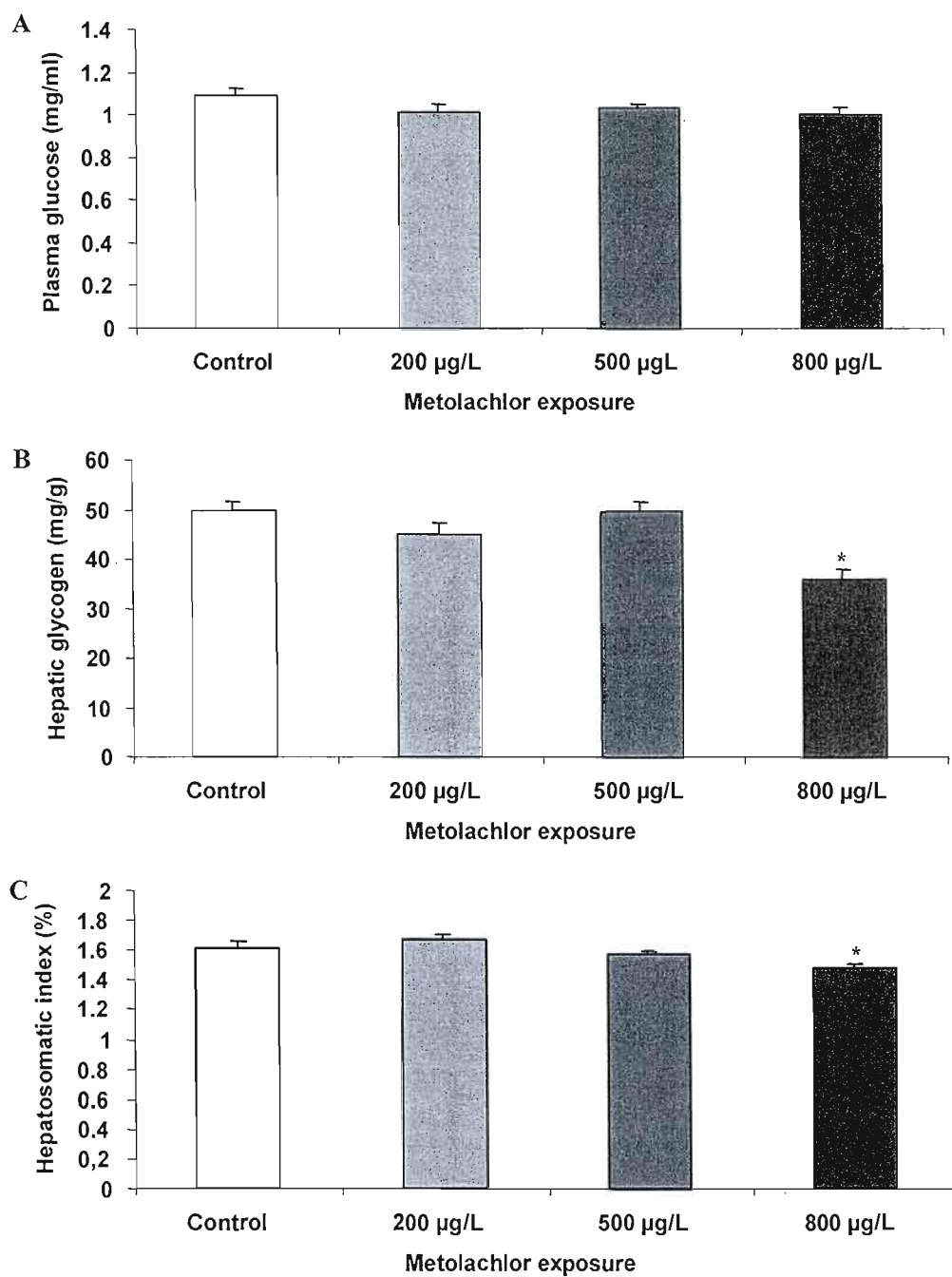


Fig. 1.3. Plasma glucose (A), hepatic glycogen (B) and hepatosomatic index (C) (mean \pm SEM) of rainbow trout following a 30-day sublethal exposure to 0, 200, 500 and 800 µg/L metolachlor. Number of fish sampled in each group was 27. Means indicated by * are significantly different from the control (Dunnett's test, $P < 0.05$).

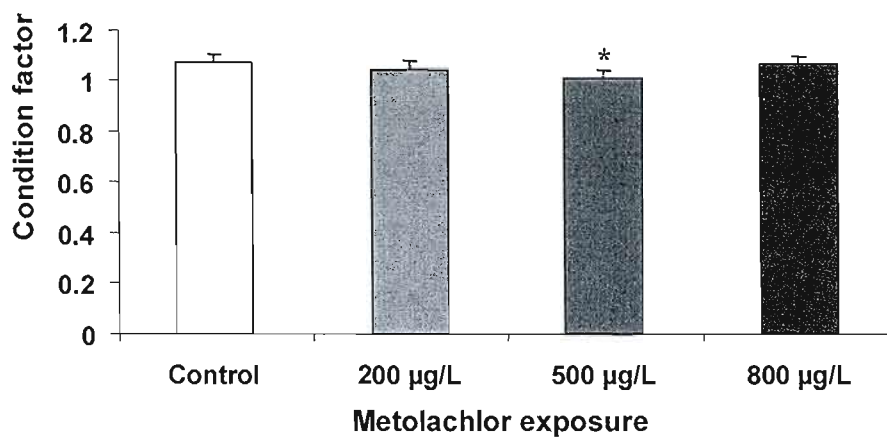


Fig. 1.4. Condition factor (mean \pm SEM) of rainbow trout following a 30-day sublethal exposure to 0, 200, 500 and 800 $\mu\text{g/L}$ metolachlor. Number of fish sampled in each group was 27. Means indicated by * are significantly different from the control (Dunnett's test, $P < 0.05$).

1.6 DISCUSSION

The aim of the present study was to evaluate, in a controlled laboratory experiment, the effects of a sublethal exposure to metolachlor on the HPI axis and the physiological status of rainbow trout.

The *in vitro* bioassay with dispersed interrenal cells exposed for 60 min to metolachlor provided evidence for an endocrine disrupting potential for this pesticide. Cytotoxicity of metolachlor in interrenal cells was low, as showed by the high LC50 (Fig. 1.1). Moreover, ACTH-stimulated cortisol secretion was impaired at concentrations 14 times lower than those that impaired cell viability, suggesting that metolachlor has the capacity to affect the intra-cellular mechanisms which lead to cortisol production without causing cellular death. Metolachlor EC50 was 79 mg/L (278 μ M) and LC50 was 1092 mg/L (3847 μ M). These results are comparable with a previously published *in vitro* study using the same bioassay for evaluation of the endocrine disrupting potential of two pesticides, endosulfan and mancozeb (Bisson and Hontela, 2002). On the basis of μ M concentrations, the effective concentration of metolachlor that impairs cortisol secretion is 7 times higher than that of endosulfan (EC50 38 μ M) but lower than mancozeb (EC50 312 μ M). Metolachlor is almost 10 times less cytotoxic than endosulfan (LC50 405 μ M) but more cytotoxic than mancozeb (LC50 > 5000 μ M). Thus the *in vitro* endocrine disrupting potential of metolachlor in fish interrenal cells lies somewhere between these two pesticides. At present, there are no data on the mechanisms of endocrine toxicity of metolachlor. Metolachlor molecular conformation contains a chlorine atom which is a reactive electrophile. The molecule easily binds to -SH groups as glutathione antioxidant. The high metolachlor concentrations could result in depletion of this antioxidant in fish interrenal cells, with subsequent oxidative stress and interaction of radical species with constituents of the intra-cellular steroidogenic pathway. Previous *in vitro* studies using the same bioassay revealed this mechanism of action for endosulfan pesticide (Dorval *et al.*, 2003). Further *in vitro* investigations are required to elucidate processes through which metolachlor impairs steroidogenesis in fish interrenal cells.

Even though the present study provided some evidence that metolachlor has an endocrine disrupting capacity in the cortisol-secreting cells during *in vitro* exposure, endocrine disruption has not been demonstrated *in vivo*. Fish exposed to metolachlor were able to elevate plasma cortisol as much as the control group in response to the standardized confinement stress (Fig. 1.2 A). Exposure to metolachlor at 800 $\mu\text{g/L}$ led to an exacerbated stress response to confinement stress, in comparison to control fish. The normal stress response in vertebrates results in the release of catecholamines (adrenaline and noradrenaline) and corticosteroid hormones (cortisol hormone for teleost fish) into the bloodstream (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999). This endocrine response evokes numerous metabolic and osmotic adaptations in order to maintain homeostasis while fish copes with the potentially adverse effects of a stressor. The rapid release of catecholamines promotes respiratory, metabolic and circulatory adjustments that facilitate the delivery of oxygen to tissues and mobilization of energy stores (Gamperl *et al.*, 1994). The cortisol release is slower but more sustained and elevated plasma levels are used as indicators of stress in fish (Mommsen *et al.*, 1999; Barton, 2002). Cortisol, an essential component of the stress response in fish, also plays a significant role in osmoregulation, growth and reproduction (Mommsen *et al.*, 1999). Under unstressed conditions, basal cortisol level is relatively low. The basal cortisol level is around 1.7 ng/ml for the rainbow trout, but cortisol post-stress can reach concentrations up to 43 ng/ml, 0.5 to 1 hour after being subjected to a 30-sec handling (Barton, 2002). In the present experiment, the stress response in the control fish, and fish exposed to 200 $\mu\text{g/L}$ and 500 $\mu\text{g/L}$ metolachlor, was less than the maximum reported value for rainbow trout. For these groups, the plasma cortisol level was around 18 to 23 ng/ml, higher than the basal plasma cortisol (around 1.7 ng/ml) but lower than the normal stress response to this kind of stimulus (around 43 ng/ml) (Pottinger and Pickering, 1992; Ruane *et al.*, 1999; Barton, 2000; Barton, 2002; Trenzado *et al.*, 2003). Presumably, this may have been the result of a sub-maximal stress stimulus. In contrast, the stress response at the highest exposure level (800 $\mu\text{g/L}$) concurs with the literature value. These fish showed an elevated plasma cortisol. Since the standardized confinement stress was the same for all the groups, the results suggest that fish exposed to 800 $\mu\text{g/L}$ metolachlor were more sensitive to the confinement stress.

Taken together, the results from the *in vitro* and the *in vivo* exposure experiments suggest that metolachlor does not have a strong endocrine disrupting potential in rainbow trout since there was no cortisol impairment *in vivo* and the EC50 of metolachlor *in vitro* was high. *In vivo*, metolachlor is extensively metabolized (Cruz *et al.*, 1993). It binds to red blood cells and is metabolised in fish liver through pathways including O-demethylation and hydroxylation of the benzylmethyl group followed by glucuronide conjugation and reductive dechlorination with subsequent glutathione conjugation (Cruz *et al.*, 1993). Biotransformation results in many metabolites including glucuronide and glutathione conjugates. Consequently, bioavailability of active molecule to steroidogenic cells can be low.

Along with the increase of plasma cortisol in the group exposed to 800 µg/L, an increase of gill Na⁺/K⁺-ATPase activity was detected (Fig. 1.2 A and 1.2.B). Cortisol, an important osmoregulatory hormone, activates ionic transport across gills by increasing the number of chloride cells and the density of the transport protein Na⁺/K⁺-ATPase in the chloride cells (Mancera and McCormick, 1999; Mommsen *et al.*, 1999; Dang *et al.*, 2000). This osmoregulatory function allows the fish to cope with different osmotic disturbances. Thus, the increase in the gill Na⁺/K⁺-ATPase activity observed in the group exposed to 800 µg/L indicates that fish exposed to this high concentration of metolachlor were subjected to an osmotic disturbance. It reflects a mechanism activated to compensate for internal ionic disturbance that could be due to a loss of ions caused by an increase in gill permeability or renal dysfunction. Alteration of gill permeability is a consequence of chemical toxicity and/or physiological action of stressor-induced catecholamine release (Heath, 1995). Chemicals like detergent and oil dispersant have been shown to enhance water permeability in fish gills and decrease serum sodium in fish (Jackson and Fromm, 1977; McKeown and March, 1978; Heath, 1995). In metolachlor composition (MSDS sheet from Syngenta Crop Protection Canada Inc.), the presence of aromatic hydrocarbon solvent and a surfactant blend, both present in 3-7 % (w/w), could have the potential to disrupt gill permeability in the group exposed to 800 µg/L. Gill permeability with loss of ions could also be enhanced by catecholamines (adrenaline and norepinephrine) secretion during the stress response i.e. under conditions that require enhanced blood oxygen transport and mobilization of energy substrates (Bonga, 1997). Catecholamines, notably the epinephrine, increase the blood flow,

distend the perfused lamellae, increase recruitment of branchial lamellae and consequently increase the effective respiratory surface area of the gills (Bonga, 1997; Perry, 1998). The increase in the functional surface area of the gills facilitates increased oxygen consumption, but also increases ion loss across the gills possibly by paracellular diffusion channels via disruption of tight junctions (Gonzalez and McDonald, 1992; Gonzalez and McDonald, 1994). This phenomenon has been termed the osmorepiratory compromise (Gonzalez and McDonald, 1992; Bonga, 1997).

Results of this study also indicate that a 30 day sublethal exposure to metolachlor can affect blood parameters. Indeed, fish exposed to 200 µg/L had a small but significant increase of hematocrit (% red blood cells) (Fig. 1.2 C), while those exposed to the highest metolachlor concentration (800 µg/L) exhibited a reduction in the hematocrit. A rise in the hematocrit can reflect a loss of plasma water and an increase in blood viscosity due to a loss of blood electrolytes through the gills. Hence, any pollutant that results in gill damage may increase the hematocrit. This condition has been observed following fish acid exposure which cause gill damage (Heath, 1995). Many chemicals are reported to cause an increase in hematocrit as well as haemoglobin concentration and/or erythrocyte count (Heath, 1995). Chronic exposure to sublethal concentrations of organic pesticides such as chlorinated hydrocarbons (aldrin, chlordane and pentachlorophenol) and detergents appears to stimulate erythropoiesis (Bansal *et al.*, 1979; Dhillon and Gupta, 1983; Heath, 1995). However, the mechanisms are not well understood. An opposite physiological response has been observed for fish exposed to 800 µg/L. These fish had a lower hematocrit compared to controls, indicating anaemia. Data from the Material Safety Data Sheet from DuPont (2005) postulate that anaemia is one of the signs of intoxication by metolachlor in human. Ingestion in human may cause an abnormal blood forming system function with anaemia or red blood cell destruction (DuPont, 2005). Metolachlor is suspected to decrease the GSH pool and raise reactive oxygen species, thus increasing vulnerability to low GSH levels in tissues such as blood, and leading to the decreased red cells count and lower hematocrit (U.S. EPA, 2001). In addition, acetamide pesticides act as urea and inhibit G6PD in red blood cells (Erdogan *et al.*, 2005). Inhibition of this important enzyme may also increase oxidative stress in these cells and affect detoxification of hydrogen peroxide and oxygen radicals. Accumulation of peroxides in the

membrane of red cell results in premature lysis of the cell (Voet and Voet, 1998). Other chemicals such as cadmium, lead, pulp mill effluent and pesticides (malathion, diazinon, cypermethrin and carbofuran) have been reported to reduce hematocrit and cause anaemia in fish (Nikinmaa, 1992; Heath, 1995; Ricard *et al.*, 1998; Svoboda *et al.*, 2001; Adhikari *et al.*, 2004). Anaemia can also occur through inhibition of erythropoiesis and hemosynthesis or increase in the rate of erythrocyte destruction in haematopoietic organs (Fischer-Scherl *et al.*, 1991; Adhikari *et al.*, 2004). Decrease in hematocrit may also be due to water gain in the blood (hemodilution) (Heath, 1995). Hence, osmoregulatory dysfunction may cause an apparent anaemia. Diminution in red blood cell count causes a decrease in the oxygen carrying capacity of blood (Adhikari *et al.*, 2004). Although fish are able to tolerate mild anaemia at rest, Jones (1971), determined that a reduction to one third of normal hematocrit causes a 34 to 40 % reduction in maximum sustained swimming speed in rainbow trout. Consequently, anaemia may be detrimental for spawning migration, feeding or escape from predators.

The one month of exposure to metolachlor did not affect the acetylcholinesterase activity (Fig. 1.2 D) and the energetic metabolism status, except for the group exposed to 800 µg/L (Fig. 1.3). Although plasma glucose was normal, these fish had a lower liver glycogen reserve along with lower hepatosomatic index (Fig. 1.3). Similar adaptive utilization of liver glycogen content to meet energy demand has been seen in tilapia (*Sarotherodon mossambicus*) exposed to sublethal concentration of fungicide Ziram (Nivedhitha *et al.*, 1998) and in rainbow trout exposed to cadmium and to *o,p'*-DDD, a metabolite of DDT (Ricard *et al.*, 1998; Benguira *et al.*, 2002). The significant decrease in glycogen content in the liver of fish exposed to 800 µg/L metolachlor, can be interpreted as sign of energy mobilisation to support mechanisms used to maintain homeostasis such as gill Na⁺/K⁺-ATPase activity and detoxification. The 30 day of metolachlor exposure did not affect food consumption or growth (data not shown). Condition factor was significantly lower only in fish exposed to 500 µg/L. Since metolachlor affects osmoregulation, the fish exposed to the higher metolachlor concentration may have higher water influx, which could affect weight.

In conclusion, the biomarkers used in the present study enabled us to evaluate some of the effects of chronic sublethal metolachlor exposure on the physiological status of fish. The results indicate that although metolachlor induced a hormonal disruption during *in vitro* exposure with interrenal rainbow trout cells bioassay, it did not impair HPI axis in the *in vivo* exposure. Since metolachlor is intensively metabolised by the liver, the toxicity in interrenal cells during *in vivo* exposures to waterborne exposures may be low. At concentration exposure $\leq 500 \mu\text{g/L}$, metolachlor had an effect only on one blood parameter (increased hematocrit). Further research is needed to study environmentally relevant metolachlor concentrations exposure effects on blood parameters. Chronic metolachlor exposure $\geq 500 \mu\text{g/L}$ showed effects linked to ionic perturbation and to activation of mechanisms for recovery. Activation of gill Na^+/K^+ -ATPase and cortisol secretion are hypothesized to reflect activation of mechanisms facilitating recovery of ions lost at the gills or kidneys. In additional studies, histology could be used to assess the integrity of membranes or tight junctions in the gills and kidney. Decrease in liver glycogen along with decrease in hepatosomatic index reflects an energy reallocation for recovery mechanisms such as osmoregulation and detoxification. No effect on growth or condition was perceived except for condition of the group exposed to $500 \mu\text{g/L}$.

Finally, the effects identified in the laboratory study would be expected to have more severe repercussions in the field, during chronic exposures. The interaction of several stressors that typically occurs in a natural environment may cause synergic, additive and potentiated effects. Effects on individuals could then be amplified and/or perceived at lower concentration of metolachlor (Murty, 1986; Klaassen, 1996). In addition, simultaneous metabolism of other pesticides present in the environment could overwhelm antioxidant defence mechanisms and increase fish vulnerability to any other toxicant or metolachlor itself.

1.7 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Lafrance and Pauline Fournier of the Institut national de la recherche scientifique Eau, Terre & Environnement (INRS-ETE), Sainte-Foy, Québec, Canada for the analyses of metolachlor in the water samples. We also thank animal care personnel of UQAM and Alexandra Gagnon, Isabelle Gariépy, Jean-François Ouellet and Guylaine Ducharme for their help with the dissections. This study was funded by the Canadian Network of Toxicology Centres (CNTC).

1.8 REFERENCES

- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T. and Ayyappan, S. 2004. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58 (2) 220-226.
- Bansal, S.K., Verma, S.R., Bupta, A.K. and Dalela, R.C. 1979. Physiological dysfunction of the haemopoietic system in a freshwater teleost (*Labeo rohita*), following chronic chlordane exposure. Part I-alterations in certain haematological parameters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 22 (4-5) 666-673.
- Barton, B.A. 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture*. 62 (1) 12-18.
- Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 42 (3) 517-525.
- Barton, B.A. and Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*. 1 : 3-26.
- Battaglin, W.A., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R. and Peter, C.J. 2000. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 123-133.
- Benguira, S., Leblond, V.S., Weber, J.P. and Hontela, A. 2002. Loss of capacity to elevate plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with a single injection of *o,p'*-dichlorodiphenyldichloroethane. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (8) 1753-1756.
- Bisson, M. and Hontela, A. 2002. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 180 (2) 110-117.
- Bleau, H., Daniel, C., Chevalier, G., van Tra, H. and Hontela, A. 1996. Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T3, T4, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 34 (3) 221-235.
- Bonga, S.E.W. 1997. The stress response in fish. *Physiological Review*. 77 (3) 591-625.

- Chuiko, G.M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: Specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*. 127: 233-242.
- Clark, G.M. and Goolsby, D.A. 2000. Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower Mississippi River. *Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 101-113.
- Cruz, S.M., Scott, M.N. and Merritt, A.K. 1993. Metabolism of [^{14}C] metolachlor in bluegill sunfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 662-668.
- Dang, Z.C., Balm, P.H.M., Flik, G., Bonga, S.E.W. and Lock, R.A.C. 2000. Cortisol increases Na^+/K^+ -Atpase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Experimental Biology*. 203 (15) 2349-2355.
- Dange, A.D. 1986. Changes in carbohydrate metabolism in tilapia, (*Oreochromis sarootherodon mossambicus*), during short-term exposure to different types of pollutants. *Environmental Pollution, Series A*. 41 (2) 165-177.
- Davies, P.E., Cook, L.S.J. and Goenarso, D. 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian fresh-water fish and crustaceans and rainbow-trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13 (8) 1341-1354.
- de Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E. and Correa, C.F. 2004. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxá (*Brycon cephalus*). *Environmental Research*. 95 (2) 224-230.
- Dhillon, S.S. and Gupta, A.K. 1983. A clinical approach to study the pollutants intoxication in a freshwater teleost (*Clarias batrachus*). *Water, Air and Soil Pollution*. 20 (1) 63-68.
- Dorval, J. and Hontela, A. 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 192 (2) 191-200.
- Dorval, J., Leblond, V.S. and Hontela, A. 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology*. 63 (3) 229-241.

- Dupont 2005. *Material Safety Data Sheet: S-Metolachlor*. Wilmington, DE. 11p. On line < http://msds.dupont.com/msds/pdfs/EN/PEN_09004a2f805f0ad0.pdf > Access date: 12/12/2005.
- Ellman, G.L., Courtney, K., L., Andres, V. and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of Ache activity. *Biochemistry and Pharmacology*. 7: 88-95.
- Erdogan, O., Hisar, O., Koroglu, G. and Ciltas, A. 2005. Sublethal ammonia and urea concentrations inhibit rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 141 (2) 145-150.
- Fischer-Scherl, T., Veaser, A., Hoffmann, R.W., Kühnhauser, C., Negele, R.-D. and Ewringmann, T. 1991. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Historical Archive)*. 20 (4) 454-461.
- Foster, G.D. and Moon, T.W. 1989. Insulin and the regulation of glycogen metabolism and gluconeogenesis in American eel hepatocytes. *General and Comparative Endocrinology*. 73 (3) 374-381.
- Gamperl, A.K., Vijayan, M.M. and Boutilier, R.G. 1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes - techniques and applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4 (2) 215-255.
- Gill, T.S., Pande, J. and Tewari, H. 1991. Effects of endosulfan and phosphamidon poisoning on the peripheral-blood of fish (*Barbus conchonus* Hamilton). *Journal of Environmental Science and Health Part A -Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control*. 26 (2) 249-255.
- Giroux, I. 2002. *Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec, campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001, et évolution temporelle de 1992 à 2001*. Québec. Ministère de l'Environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Envirodoq n° EN/2002/0365. Rapport n° QE/137. 45 p. + 5 annexes.
- Giroux, I. 2003. *Contamination de l'eau souterraine par les pesticides et les nitrates dans les régions en culture de pommes de terre*. Québec. Ministère de l'Environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Envirodoq n° ENV/2003/0233. 23 p. + 3 annexes.

- Gonzalez, R.J. and McDonald, D.G. 1992. The relationship between oxygen-consumption and ion loss in a fresh-water fish. *Journal of Experimental Biology*. 163: 317-332.
- Gonzalez, R.J. and McDonald, D.G. 1994. The relationship between oxygen uptake and ion loss in fish from diverse habitats. *Journal of Experimental Biology*. 190 (1) 95-108.
- Grenier, F. 1960. A constant flow apparatus for toxicity experiments on fish. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 32 (10) 1117-1119.
- Heath, A.G. 1995. *Water pollution and fish physiology, second edition*. Florida. 359 p.
- Holliday, C.W. 1985. Salinity-induced changes in gill $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ activity in the mud fiddler crab, (*Uca pugnax*). *Journal of Experimental Zoology*. 233 (2) 199-208.
- Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D. and Fortin, R. 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to organic contaminants and heavy-metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14 (4) 725-731.
- Jackson, W.F. and Fromm, P.O. 1977. Effect of a detergent on flux of tritiated water into isolated perfused gills of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 58 (2) 167-171.
- Jarrard, H.E., Delaney, K.R. and Kennedy, C.J. 2004. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*. 69 (2) 133-148.
- Jobling, S. 2003. Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure and Applied Chemistry*. 75 (11-12) 2219-2234.
- Jones, D.R. 1971. The effect of hypoxia and anaemia on the swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology*. 55 : 541-551.
- Kent, R.A., Pauli, B.D., Trotter, D.M. et Gareau, J. 1991. Canadian water quality guidelines for metolachlor. Water quality branch. Ottawa. Scientific series no.184. 34 p.
- Klaassen, C.D. 1996. *Casarett and Doull's toxicology : The basic science of poisons. 5th ed.* McGraw-Hill. New York. 1111 p.
- Leblond, V.S. and Hontela, A. 1999. Effects of *in vitro* exposures to cadmium, mercury, zinc, and 1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by

- dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 157 (1) 16-22.
- Lévesque, H.M., Dorval, J., Hontela, A., Van Der Kraak, G.J. and Campbell, P.G.C. 2003. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*. 66 (7) 657-676.
- Mancera, J.M. and McCormick, S.D. 1999. Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost (*Fundulus heteroclitus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 21 (1) 25-33.
- McKeown, B.A. and March, G.L. 1978. The acute effect of bunker C oil and an oil dispersant on serum glucose, serum sodium and gill morphology in both freshwater and seawater acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*. 12 (3) 157-163.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 9 (3) 211-268.
- Morgan, J.D., Sakamoto, T., Grau, E.G. and Iwama, G.K. 1997. Physiological and respiratory responses of the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 117: 391-398.
- Mukhopadhyay, P.K. and Dehadrai, P.V. 1980. Biochemical changes in the air-breathing catfish *Clarias batrachus* (Linn.) exposed to malathion. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*. 22 (2) 149-158.
- Murty, A.S. 1986. *Toxicity of pesticides to fish*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 2 : 143 p.
- Niimi, A.J. and McFadden, C.A. 1982. Uptake of sodium pentachlorophenate (NAPCP) from water by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to concentrations in the ng/l range. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 28: 11-19.
- Nikinmaa, M. 1992. How does environmental pollution affect red cell function in fish? *Aquatic Toxicology*. 22 (4) 227-238.
- Nivedhitha, H., Thangavel, P., Dawood, A.K.S. and Ramaswamy, M. 1998. Adaptive changes in the patterns of carbohydrate metabolites in blood, liver, muscle and heart

tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to the carbamate fungicide ziram. *Pesticide Science*. 52 (2) 133-137.

- Orme, S. and Kegley, S. 2004. *Pan pesticide database*. Pesticide Action Network North America. On line <<http://www.pesticideinfo.org>>. Access date: 10/10/05.
- Oruc, E.O. and Uner, N. 1999. Effects of 2,4-diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution*. 105 (2) 267-272.
- Osano, O., Nzyuko, D., Tole, M. and Admiraal, W. 2003. The fate of chloroacetanilide herbicides and their degradation products in the Nzoia basin, Kenya. *Ambio*. 32 (6) 424-427.
- Pavlov, D.D., Chuiko, G.M., Gerassimov, Y.V. and Tonkopi, V.D. 1992. Feeding-behavior and brain acetylcholinesterase activity in bream (*Abramis-brama L.*) as affected by DDVP, an organophosphorus insecticide. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*. 103 (3) 563-568.
- Perry, S.F. 1998. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 119 (1) 9-16.
- Peterson, D.E., Regehr, D.L. and Thompson, C.R. 2001. *Herbicide mode of action*. Kansas State University. 24 p.
- Pottinger, T.G. and Pickering, A.D. 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *Journal of Fish Biology*. 41: 435-447.
- Ricard, A.C., Daniel, C., Anderson, P. and Hontela, A. 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34 (4) 377-381.
- Rivard, L. 2003. *Environmental fate of metolachlor*. Environmental Monitoring Branch. Department of Pesticide Regulation. California, 14 p.
- Ruane, N.M., Wendelaar Bonga, S.E. and Balm, P.H.M. 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology*. 115 (2) 210-219.

- Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D. and Andreu-Moliner, E. 2003. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56 (3) 434-441.
- Scott, G.R. and Sloman, K.A. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*. 68 (4) 369-392.
- Scribner, E.A., Thurman, E.M. and Zimmermann, L.R. 2000. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *Science of The Total Environment*. 248 (2000) 157-167.
- Svoboda, M., Luskova, V., Drastichova, J. and Zlabek, V. 2001. The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*. 70 (4) 457-465.
- Takacs, P., Martin, P.A. and Struger, J. 2002. *Pesticides in Ontario: A critical assessment of potential toxicity of agricultural products to wildlife, with consideration for endocrine disruption*. In volume 2: Triazine herbicides, glyphosate and metolachlor. Technical Report Series No. 369. Service Canadien de la Faune. Burlington. Ontario. Canada. 127 p.
- Thompson, H.M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*. 8 (5) 369-384.
- Trenzado, C.E., Carrick, T.R. and Pottinger, T.G. 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology*. 133 (3) 332-340.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1995. *R.E.D. Facts - metolachlor*. 14 p.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2001. *The grouping of a series of chloroacetanilide pesticides based on a common mechanism of toxicity*. Health Effects Division. Office of Pesticide Programs. Washington. DC.
- Vignier, V., Vandermeulen, J.H. and Fraser, A.J. 1992. Growth and food conversion by Atlantic salmon parr during 40 days exposure to crude-oil. *Transactions of the American Fisheries Society*. 121 (3) 322-332.
- Voet, D. and Voet, J.G. 1998. *Biochimie*. DeBoeck Université. Paris. 1361 p.

- Waring, C.P. and Moore, A. 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquatic Toxicology*. 66 (1) 93-104.
- Worthing, C.R. and Walker, S.B. 1987. *The pesticide manual: A world compendium*. The British Crop Protection Council. Thornton Heath. UK. 1081 p.

CHAPITRE II

ÉVALUATION DU STATUT PHYSIOLOGIQUE DU POISSON D'EAU DOUCE EXPOSÉ AUX PESTICIDES ET AUTRES POLLUANTS AGRICOLES EN MILIEU NATUREL

2.1 RÉSUMÉ

Le bassin versant de la rivière Yamaska situé en Montérégie, draine la plus importante région agricole du Québec. L'utilisation massive de pesticides et fertilisants associée aux grandes cultures de maïs et soya a pour conséquence de contaminer une grande portion de la rivière Yamaska par des polluants agricoles. L'objectif de cette étude est d'évaluer le statut physiologique de la perchaude (*Perca flavescens*) exposée en milieu naturel aux polluants agricoles. Trois périodes d'échantillonnage ont été effectuées en 2002 et 2003 sur la rivière Yamaska. Pour chacun des échantillonnages, la valeur moyenne des biomarqueurs de perchaudes capturées en milieu contaminé par les polluants agricoles a été comparée à celle provenant de perchaudes capturées en milieu référence (lac Brome) ou moins contaminé (la rivière Yamaska Nord; localisée en sous-bassin faiblement agricole). Le facteur de condition (FC) et l'indice hépatosomatique (IHS) ont été utilisés pour évaluer l'état général de la perchaude. L'activité des cholinestérases plasmatiques a été utilisée comme biomarqueur d'exposition aux pesticides carbamates et organophosphates. Des biomarqueurs associés à plusieurs fonctions biologiques ont aussi été employés : le cortisol plasmatique pour l'évaluation de la réponse au stress; l'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPase des branchies pour l'évaluation de l'osmorégulation et le glycogène hépatique et le glucose plasmatique, pour l'évaluation du système énergétique. Les résultats provenant de la seconde campagne d'échantillonnage ont montré que le milieu contaminé par les pesticides ne diminuait pas significativement l'activité des cholinestérases plasmatiques. Toutefois, il affecte négativement la condition des perchaudes et affaiblit leur réponse au stress. Les perchaudes ont une accumulation de glycogène hépatique, une hausse de l'IHS et une augmentation de l'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPases des branchies. Ce volet a permis de dresser un portrait des effets de la pollution agricole sur les biomarqueurs utilisés. Les résultats suggèrent que la contamination agricole a un impact négatif sur le statut physiologique des perchaudes. Toutefois, des analyses approfondies des systèmes affectés permettraient de relier ces réponses à un état de santé du poisson.

2.2 INTRODUCTION

La qualité des eaux de surface est un sujet d'actualité très préoccupant puisqu'elle est directement reliée à son potentiel d'utilisation notamment pour l'eau potable, l'usage récréatif et la pêche. Malgré tous les efforts d'assainissement entrepris lors des dernières années, la dégradation de la qualité des eaux de surface se fait encore ressentir au Québec, particulièrement dans le bassin versant de la rivière Yamaska, un secteur où l'activité agricole est intensive (Coote et Gregorich, 2000; Giroux, 2004). L'élevage porcin et les grandes cultures qui sont associées augmentent l'apport de polluants agricoles tels que les pesticides et fertilisants dans la rivière Yamaska, ce qui dégrade considérablement la qualité de l'eau et de ce fait, l'écosystème de la rivière (Delisle *et al.*, 1998; Giroux, 2002).

Des suivis de l'état de la rivière Yamaska sont effectués régulièrement (Giroux, 2002; Giroux, 2004). Ces études intègrent essentiellement les paramètres physiques, chimiques et bactériologiques de l'eau ainsi que différents aspects de la structure des communautés de poissons. Contrairement à ce type d'étude environnementale, des études toxicologiques effectuées en laboratoire déterminent les effets individuels de différents pesticides sur le poisson. Celles-ci sont le plus souvent effectuées sur de courtes périodes, 30 jours ou moins, avec des concentrations plus importantes que celles retrouvées dans l'environnement (Dionne 1978; Davis, 1994). Ensemble, ces deux types d'étude permettent de connaître la qualité de l'eau et d'évaluer les effets que peuvent avoir les pesticides, pris un à un, sur le statut physiologique du poisson. Toutefois, malgré leur importance, elles ne permettent pas de connaître les effets du mélange complexe de molécules chimiques sur le poisson dans son environnement naturel. Ces effets peuvent notamment être synergiques ou cumulatifs selon les interactions chimiques et les conditions environnementales, ce qui soulève des inquiétudes considérables (Takacs *et al.*, 2002; Giroux, 2004).

L'objectif de ce volet du projet de maîtrise est d'évaluer les effets de l'exposition chronique aux polluants agricoles à des concentrations environnementales sur le statut physiologique de la perchaude (*Perca flavescens*), une espèce sentinelle. Le facteur de condition (FC) et l'indice hépatosomatique (IHS) sont utilisés afin d'évaluer l'état général du statut physiologique du poisson. L'activité des cholinestérases plasmatiques est utilisée comme

biomarqueur d'exposition aux pesticides carbamates et organophosphates. Les effets sur le statut physiologique sont évalués en utilisant divers biomarqueurs reliés à plusieurs systèmes physiologiques (voir section État des connaissances, pages 3 à 16). Le cortisol plasmatique est analysé pour l'évaluation de la réponse au stress; l'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPase branchiales, pour l'évaluation de la capacité d'osmorégulation et le glycogène hépatique et le glucose plasmatique, pour l'évaluation du système énergétique.

Trois campagnes de terrain ont été entreprises en 2002 et 2003, sur la rivière Yamaska, en Montérégie, Qc. Lors de ces études, la perchaude (*Perca flavescens*) a été capturée au filet maillant, à la senne et à l'électropêche. Pour chacune des campagnes d'échantillonnage, la valeur moyenne du biomarqueur des perchaudes capturées au site contaminé par les polluants agricoles dans la rivière Yamaska a été comparée à celle des perchaudes capturées dans un site non contaminé par les polluants agricoles, le lac Brome ou un site peu contaminé (la rivière Yamaska Nord). Les analyses des biomarqueurs ont été effectuées au laboratoire de toxicologie environnementale de l'Université du Québec à Montréal (TOXEN). Alors que l'analyse des pesticides dans l'eau a été réalisée par le Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ).

Compte tenu du stress chimique chronique et des effets toxiques potentiels des pesticides et autres contaminants agricoles, l'hypothèse principale est que le statut physiologique des perchaudes capturées dans le milieu contaminé devrait être négativement affecté comparativement aux perchaudes capturées dans le milieu exempt de pesticides. Plus spécifiquement, cela devrait se traduire par un facteur de condition plus faible. De plus, l'activité des cholinestérases devrait être plus faible puisque des pesticides inhibiteurs des organophosphates, tel que le diazinon, sont fréquemment détectés dans les eaux de surface du bassin versant de la rivière Yamaska (Giroux, 2004).

Plusieurs pesticides présents dans la rivière ont le potentiel d'être perturbateur endocrinien (Giroux, 2004) et d'entre eux ciblent particulièrement l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal (Benguira, 2002; Dorval, 2003). En conséquence, la réponse des perchaudes au

stress de capture devrait être affectée. Ainsi, elles devraient avoir un niveau de cortisol plasmatique plus bas.

Les branchies du poisson sont en contact étroit avec leur milieu, elles sont donc vulnérables à la présence de contaminants dans l'environnement aquatique. Plusieurs pesticides et autres polluants ont un pouvoir inhibiteur sur les enzymes Na^+/K^+ -ATPase des branchies (Lévesque *et al.*, 2003; Sancho *et al.*, 2003; Waring et Moore, 2004). L'activité de ces enzymes devrait donc être plus faible.

Le glycogène hépatique devrait être plus faible vu la demande énergétique requise afin de lutter contre les stressseurs chimiques présents dans cet environnement (Dange, 1986; Bleau *et al.*, 1996).



Figure 2.1 Image satellite modifiée montrant la qualité de l'eau (indice de la qualité bactériologique et physicochimique de 1997-1998 déterminée par le MDDEP), l'étendue des terres agricoles ainsi que les sites de capture de la perchaude sur le bassin versant de la rivière Yamaska. Valeur qualitative de l'IQBP tirées de: <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/sys-image/global/index.htm/etat>

2.3 MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.3.1 Région à l'étude

Cette étude écotoxicologique a été effectuée sur la rivière Yamaska, en Montérégie. La rivière Yamaska prend sa source dans le lac Brome et se déverse dans le fleuve Saint-Laurent à la hauteur du lac Saint-Pierre. Elle draine un bassin versant d'une superficie de 4 784 km², dont 63 % du territoire est occupé par l'activité agricole, notamment l'élevage porcin et la culture de maïs (Coote et Gregorich, 2000). Ces activités influencent grandement la qualité de l'eau de la rivière. Selon le ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs (MDDEP), l'indice de la qualité bactériologique et physicochimique (IQBP) qui est basé sur des descripteurs classiques de la qualité de l'eau (phosphore, coliformes fécaux, turbidité, matière en suspension, azote ammoniacal, nitrites-nitrates, chlorophylle *a* totale, pH, DBO₅ et pourcentage en oxygène dissout) révèle que la qualité de l'eau de la rivière Yamaska se dégrade au fur et à mesure que l'on se dirige vers son embouchure (Delisle *et al.* 1998; Hébert, 1997). Elle est bonne à sa source qui est le lac Brome, douteuse à mauvaise dans le secteur de la rivière Yamaska Nord, entre le réservoir Choinière et le lac Boivin, et très mauvaise à partir du secteur en aval de Granby, qui comprend les municipalités de Farnham, Saint-Césaire, Saint-Hyacinthe, Saint-Hugues, Yamaska et ce, jusqu'à l'embouchure (Figure 2.1). Parallèlement au gradient décroissant de la qualité de l'eau de l'amont vers l'aval, une multitude de pesticides provenant des grandes cultures avoisinantes contaminent l'eau de la rivière Yamaska (Giroux, 2002; Giroux, 2004). Parmi les pesticides les plus fréquemment décelés se retrouvent l'atrazine et le métolachlore, des herbicides tous deux associés à la culture du maïs (Giroux, 2002). L'image satellite (Figure 2.1) représente la qualité de l'eau de la rivière Yamaska et permet de constater l'intensité des grandes cultures sur le secteur nord-ouest du bassin versant. La Yamaska est donc une rivière de choix pour étudier les effets chroniques de l'exposition des poissons aux polluants agricoles.

2.3.2 Analyse de l'eau

L'eau de surface a été prélevée à 30cm de profondeur et transférée dans deux bouteilles, dont une contenait de l'acide sulfurique 5N pour préserver les pesticides de type aryloxyacide. Dans un délai inférieur à sept jours, deux groupes de pesticides ont été dosés par le CEAEQ: les pesticides de type organophosphoré, triazine et autres ainsi que ceux du type aryloxyacide.

Les pesticides de type organophosphoré, triazine et autres ont été extraits à l'aide de dichlorométhane puis concentrés sous jet d'argon. Ces pesticides ont été séparés sur une colonne de chromatographie à phase gazeuse et ensuite identifiés et quantifiés à l'aide d'un spectromètre de masse. La concentration des pesticides de type aryloxyacide a été déterminée suivant une extraction avec C-18, une estérification et un dosage par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CEAEQ, 2006).

L'eau a été analysée durant la période du 4 au 12 juin 2002, c'est-à-dire quelques mois avant la première campagne d'échantillonnage du poisson. Pour la seconde campagne, l'eau a été échantillonnée la première journée de l'échantillonnage de la perchaude à chaque site. Quant aux résultats utilisés pour la troisième campagne, les concentrations des pesticides dans l'eau proviennent d'une étude qui a été entreprise par Boily *et al.* (2005) sur le bassin versant de la rivière Yamaska le 4 août 2003.

2.3.3 Choix de l'espèce sentinelle : la perchaude (*Perca flavescens*)

La perchaude (*Perca flavescens*) est l'espèce désignée pour évaluer les effets de l'exposition aux pesticides sur le statut physiologique du poisson pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elle est plus tolérante et a une meilleure capacité d'adaptation que plusieurs autres espèces de poissons (Scott et Crossman, 1974). Ainsi, malgré la pollution agricole, elle est encore retrouvée dans plusieurs secteurs de la rivière Yamaska (Laviolette, 1999). De plus, vu ses déplacements limités, elle reflète bien la contamination du milieu (Aalto et Newsome, 1990). Enfin, les perchaudes sont grégaires, ce qui facilite la pêche (Scott et Crossman, 1974).

2.3.4 Campagnes d'échantillonnage

Campagne d'échantillonnage n° 1 (30 septembre et 6 octobre 2002)

Cette première campagne d'échantillonnage a été réalisée en septembre et octobre 2002. Les sites ont été choisis en se basant sur la concentration de pesticides détectés dans la rivière Yamaska à la mi-juin (Tableau 2.1). Ainsi, des efforts de pêche au filet maillant ont été déployés à partir de l'amont de la ville Yamaska jusqu'à l'embouchure de la rivière. Les efforts se sont avérés peu fructueux pour la perchaude près de la ville de Yamaska, un secteur où la concentration en pesticides est plus importante. En conséquence, le site

d'échantillonnage choisi a été relocalisé plus près du lac Saint-Pierre dans l'embouchure de la rivière (Figure 2.1, YAM-03). L'échantillonnage a été réalisé le 30 septembre 2002. Le lac Brome (Figure 2.1, BR2002), site de référence non contaminé par les pesticides, a été échantillonné le 6 octobre 2002. La capture du poisson a été réalisée au filet maillant sur la rivière et à la senne au lac Brome. Enfin, lors de l'échantillonnage des perchaudes au lac Brome, une prolifération de cyanobactéries était visible. Les cyanobactéries n'ont pas été intégrées dans les analyses de cette campagne. Toutefois, il y a aussi eu une prolifération de cyanobactéries entre août et octobre 2001 dans ce lac. Des analyses effectuées par Rolland *et al.* (2005) y avaient décelé la présence de cyanobactéries de souches toxiques.

Campagne d'échantillonnage n° 2 (3 au 13 juin 2003)

Cette campagne d'échantillonnage a été réalisée du 3 au 13 juin 2003. Les dates d'échantillonnage ont été déterminées selon les résultats du suivi des pesticides de la rivière Yamaska effectué de 1999 à 2001 par le MDDEP. Ces études ont montré que les concentrations d'herbicides augmentaient rapidement dans le mois suivant l'application des pesticides au champ, soit normalement en juin (Giroux, 2002). La senne a été exclusivement utilisée lors de cette campagne. Ainsi, comme ce type d'engin de pêche nécessite l'accès aux berges, le site contaminé par les pesticides a été relocalisé à 4,2 km en amont de l'embouchure de la rivière (Figure 2.1, site YAM-02). À nouveau, le lac Brome (BR2003) a été utilisé comme site de référence.

Campagne d'échantillonnage n° 3 (4 et 12 septembre 2003)

Cette dernière campagne d'échantillonnage a eu lieu le 4 et 12 septembre 2003 et a été réalisée en collaboration avec le MDDEP. Cette fois, l'échantillonnage du poisson a été réalisé à la pêche électrique. Le site plus contaminé par les pesticides (Figure 2.1, YAM-01) se trouve à St-Hugues, dans une région où l'activité agricole est intensive. Le site de référence (Figure 2.1, YAM-N) est situé sur la branche Nord de la rivière Yamaska entre le réservoir Choinière et le lac Boivin. L'IQBP de l'eau est considérée comme douteuse à mauvaise selon le MDDEP. Toutefois, les activités agricoles sont plus faibles dans ce secteur et peu de pesticides y sont détectés (Boily *et al.*, 2005).

2.3.5 Capture de la perchaude

Lors de la première campagne, la capture de la perchaude au site de l'embouchure a été effectuée au filet maillant. Des filets étaient installés pour une période d'une heure tout au long de la journée. Les perchaudes du lac Brome de la première campagne et celles de la seconde campagne ont été capturées exclusivement à la senne de rivage. Pour la troisième campagne, la capture a été réalisée à la pêche électrique. Indépendamment du type d'engin de pêche utilisé, les perchaudes capturées ont été aussitôt transférées dans un enclos flottant au site de capture. Après 20 captures, les perchaudes ont été anesthésiées par immersion dans un bassin contenant une solution de tricaine de méthanesulfonate (MS 222, 0.15g/L) (Sigma, St. Louis, Mo.). Une fois l'anesthésie complétée, les paramètres physiologiques ont été notés et les prélèvements, tels que décrits dans la prochaine section, ont été effectués.

2.3.6 Prélèvements

Sous anesthésie, une saignée a été effectuée par la veine caudale à l'aide d'une seringue héparinée. Le sang a été ensuite centrifugé durant 5 minutes à 13 000 rpm afin de séparer le plasma, lequel a été immédiatement cryopréservé dans l'azote liquide. Par la suite, toujours en état d'anesthésie générale, la perchaude a été euthanasiée par rupture cervicale et gardée sur glace jusqu'au laboratoire. Les caractéristiques physiologiques ont été ensuite notées lors de la dissection : poids total (g) (précision de 0,01g), longueur totale (cm), poids du foie (g). Le foie et les branchies ont été disséqués et rapidement congelés dans l'azote liquide avant d'être mis au congélateur à - 80 °C jusqu'à l'analyse.

2.3.7 Analyse des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont décrits en profondeur dans la section « État des connaissances » du présent ouvrage. Le facteur de condition ($\text{masse (g)} / \text{longueur (cm)}^3 \times 100$) et l'indice hépatosomatique ($\text{masse foie (g)} / \text{masse corporelle (g)} \times 100$) ont été utilisés comme indices de condition.

Des solutions étalons ont été utilisées afin de vérifier la précision des analyses des biomarqueurs. Le cortisol plasmatique a été dosé par radio-immunologie à l'aide de la trousse No. 07-221102 (ICN Biochemicals Canada, Ltd, Montréal, Qc). Cet essai a été décrit

antérieurement par Hontela *et al.* (1995). L'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPase des branchies a été déterminée par analyse colorimétrique selon la méthode décrite par Lévesque *et al.* (2003). La réserve énergétique de glycogène hépatique a été évaluée selon la méthode enzymatique décrite par Bleau *et al.* (1996). Le glucose plasmatique a été déterminé par la méthode de l'oxydase glucose (GOD-PAP, Boehringer Massheim, Diagnostic). L'évaluation de l'activité des cholinestérases plasmatiques a été réalisée à l'aide de la méthode de Ellman *et al.* (1961).

2.4 STATISTIQUES

Pour chacune des campagnes d'échantillonnage, les valeurs moyennes des biomarqueurs ont été comparées entre le site contaminé par les pesticides et le site de référence. Compte tenu des différents groupes de tailles de poissons entre les sites, les moyennes ont été comparées par une analyse de covariance (ANCOVA, $\alpha < 0,05$) afin d'éliminer la variabilité due au poids du poisson. Ainsi, lorsque possible, les valeurs moyennes des biomarqueurs ont été ajustées pour un poids moyen et sont présentées dans les tableaux de résultats. En l'absence de covariance avec le poids, une analyse de variance (ANOVA) et un test de Student ($\alpha < 0,05$) ont été réalisés. Lorsque les conditions d'application (normalité et homoscedasticité des résidus) n'étaient pas respectées malgré diverses transformations, un test non-paramétrique de Wilcoxon ($\alpha < 0,05$) a été utilisé. Le sexe n'a pas été considéré, puisqu'il s'agissait principalement d'individus immatures. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel de traitement statistique JMP 5.1 de SAS.

2.5 RÉSULTATS

Campagne n° 1

Une multitude de pesticides a été détectée dans la rivière Yamaska au niveau des municipalités de Saint-Hyacinthe et Yamaska. Toutefois, des concentrations plus faibles ont été détectées au site YAM-03 localisé à l'embouchure de la rivière (Tableau 2.1). Aucun pesticide n'a été décelé au site référence BR2002. Cependant, une prolifération de cyanobactéries était visible durant cette période d'échantillonnage.

La valeur médiane du poids des perchaudes capturées au site YAM-03 est plus petite que celle des perchaudes capturées au site BR2002 ($28,90 < 47,04\text{g}$, $p = 0,0018$). Toutefois, la relation de poids-longueur est la même aux deux sites ($p = 0,0622$). En conséquence, pour une même longueur, le poids des perchaudes du site YAM-03 est significativement supérieur ($49,8 \pm 1,02 > 34,7 \pm 1,02\text{g}$, $p = 0,0001$). De ce fait, le facteur de condition est aussi plus élevé au site YAM-03 ($1,38 \pm 0,03 > 1,03 \pm 0,03$, $p < 0,0001$). L'indice hépatosomatique moyen est significativement plus faible au site YAM-03 ($0,9 \pm 0,04 < 1,11 \pm 0,05$, $p = 0,0016$) et le niveau de glycogène hépatique est semblable entre les deux sites. Les perchaudes du site YAM-03 ont une activité des cholinestérases plasmatiques significativement supérieure à celle des perchaudes capturées au site BR2002 ($0,29 \pm 0,04 > 0,19 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{mol/ml/h}$, $p = 0,0405$). Les résultats obtenus pour l'analyse du cortisol plasmatique révèlent une réponse cortisolique beaucoup plus importante pour les perchaudes du site YAM-03 ($167,11 \pm 1,15 > 93,3 \pm 1,12 \text{ ng/ml}$, $p = 0,0043$).

Campagne n° 2

Les résultats de l'analyse des pesticides pour cette seconde étude ont confirmé la présence soupçonnée de pesticides dans la rivière Yamaska au site YAM-02, localisé à 4,2 km en amont de l'embouchure. Le site de référence, lac Brome (BR2003) en était toujours exempt (Tableau 2.2).

Le poids moyen ajusté des perchaudes capturées au site YAM-02 est significativement inférieur à celui des perchaudes capturées au site BR2003 ($15,45 \pm 1,01 < 16,48 \pm 1,02\text{g}$, $p < 0,0047$) (Tableau 2.5). De plus, leur facteur de condition est significativement plus faible

($1,00 \pm 0,01 < 1,21 \pm 0,02$, $p < 0,0001$). L'indice hépatosomatique est significativement plus élevé ($1,40 \pm 0,05 > 1,22 \pm 0,03$, $p = 0,0363$). L'activité des cholinestérases plasmatiques tend à être plus faible pour les perchaudes du site YAM-02, toutefois sans différence significative avec le site de référence, $p = 0,2255$. Les perchaudes du site YAM-02 ont une réponse au stress de capture diminuée ($75,85 \pm 1,10 < 154,88 \pm 1,07$ ng/ml, $p < 0,0001$). Leur moyenne ajustée du glucose plasmatique est semblable à celle du site BR2003 ($0,42 \pm 0,05 = 0,47 \pm 0,08$ mg/ml, $p = 0,6235$). Le glycogène hépatique est significativement plus élevé ($7,41 \pm 1,26 > 1,62 \pm 1,17$ mg/g, $p < 0,0001$) de même que l'activité des Na^+/K^+ -ATPase des branchies ($60,25 \pm 1,14 > 30,20 \pm 1,26$ $\mu\text{mol/mg prot./h.}$, $p = 0,0084$).

Campagne n° 3

Les données provenant de Boily *et al.* (2005) confirment la présence de pesticides dans la rivière Chibouet à St-Hugues (rivière qui se déverse dans la rivière Yamaska, en amont du site échantillonné) et une très légère contamination sur la rivière Yamaska Nord (Tableau 2.3).

Le poids médian des perchaudes capturées au site YAM-01 est plus faible que celui des perchaudes capturées au site de référence, le site YAM-N (Tableau 2.6). Néanmoins, leur poids moyen ajusté est significativement plus élevé ($39,72 \pm 1,02 > 34,51 \pm 1,02$ g, $p < 0,0001$), de même que leur facteur de condition ($1,13 \pm 0,02 > 1,02 \pm 0,01$, $p < 0,0001$). Leur niveau de cortisol ajusté est significativement plus élevé ($194,98 \pm 1,14 > 38,90 \pm 1,13$ ng/ml, $p < 0,0001$). Aucune différence significative n'est révélée pour le glucose plasmatique et le glycogène entre les deux sites. L'indice hépatosomatique est significativement supérieur pour les perchaudes du site YAM-01 ($0,95 \pm 0,07 > 0,80 \pm 0,03$, $p = 0,0469$). Pour terminer, l'activité des enzymes cholinestérases plasmatiques ainsi que celle des Na^+/K^+ -ATPase branchiale ne sont pas différents entre les deux sites.

Les résultats des trois campagnes d'échantillonnage sont présentés dans les tableaux 2.1 à 2.3 pour les pesticides et 2.4 à 2.6 pour les biomarqueurs.

Tableau 2.1

Pesticides ($\mu\text{g/l}$) ^a détectés du 4 au 12 juin 2002 à plusieurs stations d'échantillonnage de la rivière Yamaska

Pesticides	Lac Brome (BR2002)	Saint-Hyacinthe	Yamaska	Embouchure (YAM-03)
Dééthyl-atrazine ^b	< 0,04	0,04	0,06	< 0,04
Epte ^b	< 0,03	0,03	< 0,03	< 0,03
Simazine ^b	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01
Atrazine ^b	< 0,02	0,27	0,32	0,02
Métolachlore ^b	< 0,01	0,48	0,33	0,01
Diméthénamide ^b	< 0,02	0,04	0,07	< 0,02
Dicamba ^c	< 0,03	0,20	0,25	< 0,03
Mécoprop ^c	< 0,01	0,03	0,04	< 0,01
MCPA ^c	< 0,01	0,02	< 0,01	< 0,01
2,4-D ^c	< 0,02	0,05	< 0,02	< 0,02

^a Deux groupes de pesticides analysés : ^b *organophosphorés, triazines et autres* ainsi que ^c les *aryloxyacides*. Analyses effectuées par Philippe Daigle du CEAEQ, MDDEP.

Tableau 2.2

Données physicochimiques et pesticides ^a détectés du 6 au 10 juin 2003 dans l'eau de surface des sites d'échantillonnage de la campagne n° 2

	Site de référence	Site contaminé par les pesticides
	Lac Brome (BR2003)	Rivière Yamaska (YAM-02)
Données physicochimiques		
Température °C	18,5	21,4
pH	6,3	8,5
Surface (ha)	1439 ^b	-
Profondeur maximale, moyenne (m)	12,9 ^b	-
O ₂ (mg/L)	9,46 ^b	-
Phosphore total (mg/L)	0,021 ^b	0,181 ^c
Azote total (mg/L)	0,52 ^b	2 ^c
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0,051 ^b	0,13 ^c
Pesticides détectés (µg/l)		
Dicamba	< 0,03	0,07
Atrazine	< 0,02	0,31
Métolachlore	< 0,01	0,34
Diméthénamide	< 0,02	0,08

^a Analyses effectués par Nathalie Dassylva et Christian Deblois du CEAEQ (MDDEP).

^b Données tirées de l'étude de Rolland *et al.* (2005), valeurs moyennes été 2001.

^c Données provenant du MDDEP (Delisle *et al.*, 1998)

Tableau 2.3

Pesticides ($\mu\text{g/l}$) détectés le 4 août 2003 dans l'eau de surface des régions échantillonnées lors de la campagne n° 3 ^a.

Pesticides détectés	Rivière Yamaska Nord Agriculture de faible intensité (YAM-N)	Rivière Chibouet Agriculture intensive
Dicamba	-	0,05
Atrazine	0,05	0,72
Métolachlore	0,10	0,26
Diméthénamide	-	-
Clopyralide	-	0,18
Bentazone	-	1,10
Desisopropyl-atrazine	-	0,06
Diethyl-atrazine	0,04	0,20

^a Données provenant de Boily *et al.* (2005).

Tableau 2.4

Campagne n° 1

Indices morphométriques et valeurs des biomarqueurs (moyenne \pm erreur type) des perchaudes capturées à la senne au site de référence BR2002 et au filet maillant au site YAM-03 en 2002. L'astérisque (*) indique une valeur significativement différente du site de référence. n = nombre de perchaudes.

Biomarqueurs	Site référence	Site contaminé par les pesticides	<i>P</i>
	BR2002 <i>n</i> =20	YAM-03 <i>n</i> =23	
Poids médian (g) (min.-max.)	47,04 (22,10-278,06)	28,90 (16,8-117,30)	
Poids moyen ajusté (g)	34,7 \pm 1,02	49,8 \pm 1,02 *	< 0,0001
Facteur de condition	1,03 \pm 0,03	1,38 \pm 0,03 *	< 0,0001
Indice hépatosomatique	1,11 \pm 0,05	0,9 \pm 0,04 *	0,0016
Cholinestérases plasmatiques (μ mol/ml/h)	0,19 \pm 0,03	0,29 \pm 0,04 *	0,04
Cortisol plasmatique (ng/ml)	93,3 \pm 1,12	167,11 \pm 1,15 *	< 0,0018
Glycogène hépatique (mg/g)	0,98 (0,70-1,36)	0,88 (0,61-1,27)	0,62

Tableau 2.5

Campagne n° 2

Indices morphométriques et valeurs des biomarqueurs (moyenne \pm erreur type ou min.-max.) des perchaudes capturées à la senne au site de référence BR2003 et au site contaminé par les pesticides YAM-02 en juin 2003. L'astérisque (*) indique une valeur significativement différente du site de référence. n =nombre de perchaudes.

Biomarqueurs	Site référence	Site contaminé par les pesticides	<i>P</i>
	BR2003 <i>n</i> =45	YAM-02 <i>n</i> =54	
Poids médian (g) (min.-max.)	23,30 (12,10 -155,90)	6,65 (3,7 - 59,3)	< 0,005
Poids moyen ajusté (g)	16,48 \pm 1,02	15,45 \pm 1,01 *	
Facteur de condition	1,21 \pm 0,02	1,00 \pm 0,01 *	< 0,0001
Indice hépatosomatique	1,22 \pm 0,03	1,40 \pm 0,05 *	0,036
Cholinestérases plasmatiques (μ mol/ml/h)	0,66 (0,56-0,78)	0,41 (0,31-0,54)	0,22
Glucose plasmatique (mg/ml)	0,53 \pm 0,04	0,30 \pm 0,05	0,62
Glucose moyen ajusté (mg/ml)	0,47 \pm 0,08	0,42 \pm 0,05	
Glycogène hépatique (mg/g)	1,62 \pm 1,17	7,41 \pm 1,26 *	0,0001
Activité Na ⁺ / K ⁺ -ATP ase branchiale (μ mol/mg prot./h.)	30,20 \pm 1,26	60,25 \pm 1,14 *	0,0084
Cortisol plasmatique (ng/ml)	154,88 \pm 1,07	75,85 \pm 1,10 *	0,0001

Tableau 2.6

Campagne n° 3

Indices morphométriques et valeurs des biomarqueurs (moyenne \pm erreur type ou min.-max.) des perchaudes capturées à la pêche électrique au site de référence faiblement contaminé par les pesticides, YAM-N, et au site contaminé par les pesticides, YAM-01 en septembre 2003. L'astérisque (*) indique une valeur significativement différente du site de référence. n =nombre de perchaudes.

Biomarqueurs	Référence faible contamination	Site contaminé par les pesticides	<i>P</i>
	YAM-N <i>n</i> =40	YAM-01 <i>n</i> =21	
Poids médian (g) (min.-max.)	41,90 (25,90-91,70)	23 (4,8-96,10)	0,0001
Poids moyen ajusté (g)	34,51 \pm 1,02	39,72 \pm 1,02 *	
Facteur de condition	1,02 \pm 0,01	1,13 \pm 0,02 *	0,0001
Indice hépatosomatique	0,80 \pm 0,03	0,95 \pm 0,07 *	0,0469
Cholinestérases plasmatiques (μ mol/ml/h)	1,37 \pm 0,15	1,15 \pm 0,18	0,5797
Cortisol plasm. (ng/ml)	46,77 (42,7-51,29)	165,96 (81,97-181,36)	0,0001
Cortisol plasm. ajusté (ng/ml)	38,90 \pm 1,13	194,98 \pm 1,14 *	
Glucose plasmatique (mg/ml)	1,19 \pm 0,07	1,45 \pm 0,15	0,1536
Glycogène hépatique (mg/g)	7,05 \pm 2,56	6,25 \pm 2,24	0,2478
Activité Na ⁺ /K ⁺ -ATP ase branchiale (μ mol/mg prot./h.)	48,44 \pm 4,46	44,37 \pm 4,76	0,7637

2.6 DISCUSSION

Campagne n° 1

Lors de la première campagne d'échantillonnage, les résultats d'analyse de l'eau ont révélé la présence de pesticides au niveau de l'embouchure de la rivière Yamaska (YAM-03). Toutefois, en faible concentration comparativement à ce qui a été retrouvé en amont dans la municipalité de Yamaska et à Saint-Hyacinthe (Tableau 2.1). Aucun pesticide n'a été détecté au lac Brome en 2002 (BR2002). Cependant, lors de l'échantillonnage, il y avait une floraison de cyanobactéries semblable à celle qui est survenue à la fin de la saison estivale 2000 et 2001 (Chevalier *et al.*, 2001; Rolland *et al.*, 2005). Comme ces cyanobactéries peuvent libérer des neurotoxines ainsi que des hépatotoxines, elles ont des effets physiologiques potentiels non négligeables sur les organismes vivants (Rolland *et al.*, 2005).

L'analyse de l'activité des cholinestérases plasmatiques a révélé une activité significativement plus élevée pour les perchaudes du site YAM-03 contrairement à ce qui était attendu. En effet, puisqu'il y a présence de pesticides dans la rivière et non au lac Brome, l'activité aurait dû être plus faible au site YAM-03. Néanmoins, il se peut que ce résultat révèle la présence d'un inhibiteur des cholinestérases autre que les pesticides carbamates ou organophosphates au lac Brome. Il est possible que la plus faible activité des cholinestérases chez les perchaudes de ce site soit attribuable à la présence de cyanotoxines ou autre inhibiteur durant cette période. D'ailleurs, certaines floraisons de cyanobactéries retrouvées dans le lac Brome en 2001 ont un potentiel d'inhibition des cholinestérases (Mahmood et Carmichael, 1987; Henriksen *et al.*, 1997; Rolland *et al.* 2005).

Le facteur de condition est plus élevé pour les perchaudes provenant de YAM-03 que celles provenant de BR2002. Leur indice hépatosomatique (IHS) est aussi plus faible. Habituellement, l'augmentation du poids du foie relativement au poids total de l'individu est reliée à un métabolisme hépatique plus élevé ou une pathologie hépatique. De nombreuses études supportent aussi l'hypothèse d'une relation cause à effet entre l'exposition à certains contaminants et l'augmentation du volume du foie (Bury *et al.*, 1997; Chevalier *et al.*, 2001;

van der Oost *et al.*, 2003). Il aurait été intéressant d'approfondir les analyses afin de déterminer si les perchaudes du lac Brome pouvaient être utilisées comme référence ou si elles étaient affectées par la présence de cyanotoxines ou autre type de contaminant. L'analyse de l'hormone cortisol a révélé une réponse au stress beaucoup plus importante au site YAM-03. Toutefois, ce résultat est difficilement comparable à celui obtenu au lac Brome, puisque les méthodes de pêches étaient différentes. La pêche au filet maillant au site YAM-03 a sans doute favorisé à accroître la réponse au stress chez le poisson comparativement à la pêche à la senne au lac Brome, puisque le temps de capture est plus long et que le poisson s'agite pour se libérer, ce qui augmente son niveau de stress. Ainsi, la réponse au stress est biaisée par les deux méthodes de captures différentes pour cette campagne. Le glycogène hépatique ne présente aucune différence entre les deux sites échantillonnés. Le métabolisme énergétique est semblable entre les deux sites.

Les résultats provenant de cette première campagne d'échantillonnage ont permis de constater que les perchaudes capturées dans la rivière Yamaska à son embouchure sont en meilleure condition que celles capturées au lac Brome. La floraison de cyanobactéries a possiblement un effet sur le statut physiologique des perchaudes du lac Brome à cette période de l'année.

Campagne n° 2

L'analyse des pesticides a révélé la présence de plusieurs pesticides au site YAM-02, tandis qu'aucun n'a été détecté au site de référence, le lac Brome. Malgré cela, l'activité des cholinestérases plasmatiques n'a pas été significativement affectée chez les perchaudes provenant du site YAM-02. Ce résultat suggère que les perchaudes n'étaient pas exposées à un inhibiteur de cholinestérases.

De plus, une diminution significative du facteur de condition a été observée chez les perchaudes du site YAM-02. Des résultats semblables ont été aussi retrouvés chez la grenouille (*Rana catesbeiana*) capturée en milieu contaminé par les pesticides dans le bassin

versant de la rivière Yamaska (Boily *et al.*, 2005). La croissance peut être affectée directement par les pesticides. À titre d'exemple, l'herbicide atrazine retrouvé en concentrations environnementales dans l'eau diminue la croissance du poisson rouget commun (*Sciaenops ocellatus*) en prolongeant son stade larvaire (Alvarez et Fuiman, 2005). Toutefois, l'effet peut aussi dépendre de plusieurs autres facteurs. De façon indirecte, les communautés d'organismes inférieurs de la chaîne trophique (algues, larves d'insectes, petits poissons, etc.) peuvent aussi être touchées par la présence des pesticides et autres polluants. Conséquemment, le régime alimentaire de la perchaude peut être changé (Fleeger *et al.*, 2003). À cela s'ajoute l'augmentation de la compétition intraspécifique pour la ressource alimentaire.

L'indice hépatosomatique des perchaudes du site YAM-02 est supérieur à celui des perchaudes du site BR2003 et significativement relié à la concentration de glycogène dans le foie pour cette campagne d'échantillonnage (r^2 0,335 ; $p < 0,0001$). Il est bien connu que les réserves énergétiques en glycogène diminuent dans le foie suite à l'exposition à un pesticide imposée sur une courte période chez le poisson (Dange, 1986; de Aguiar *et al.*, 2004). Par exemple, une exposition de 96 heures de l'anguille (*Anguilla anguilla*) à une dose sous-létale de l'insecticide lindane diminue de façon significative les réserves hépatiques de glycogène (Ferrando et Andreumoliner, 1992). À l'opposé, lors d'une exposition environnementale chronique aux métaux et aux pesticides, le glycogène a plutôt tendance à s'accumuler dans le foie du poisson (Hontela *et al.*, 1995). Roche *et al.* (2002) ont mis en évidence des corrélations hautement significatives entre le niveau de glycogène hépatique et le niveau de pesticides dans le foie. Notamment, ils ont montré une corrélation positive hautement significative entre le glycogène et le fluoranthène dans le foie de l'anguille (*Anguilla anguilla*), entre le glycogène et le benzo-a-pyrène chez la barbotte noire (*Ictalus melas*) et entre le glycogène et les biphényles polychlorés chez la carpe (*Carassius auratus*). Il se pourrait donc que le niveau de glycogène dans le foie des poissons capturés en milieu naturel soit le reflet de son niveau de contamination. L'analyse de pesticides dans le foie aurait pu vérifier cette hypothèse. La raison de l'accumulation du glycogène dans le foie des poissons provenant d'un milieu contaminé n'est pas claire. Cependant, l'augmentation de l'indice

hépatosomatique suite à l'exposition chronique à un toxique est mieux connue. Cet effet peut résulter de l'hyperplasie et de l'hypertrophie des cellules hépatiques, une réponse adaptative qui permet d'augmenter la capacité de détoxification du foie (Heath, 1995). Ceci est observé notamment suivant une exposition à un contaminant organique (van der Oost *et al.* 2003). L'effet peut aussi être le reflet d'une altération pathologique des cellules hépatiques (van der Oost *et al.*, 1992). Enfin, les résultats de la présente étude suggèrent un effet du site YAM-02 sur le métabolisme hépatique. Malgré l'augmentation du volume hépatique et du glycogène hépatique, le niveau de glucose plasmatique n'est pas différent entre les sites.

Le site YAM-02 affecte négativement la sécrétion cortisolique en réponse au stress. Pour ces perchaudes, la réponse cortisolique est environ deux fois plus faible que celle des perchaudes provenant du lac Brome. Dorval *et al.* (2005) et Hontela *et al.* (1995) ont également montré une réponse cortisolique plus faible chez le meunier noir provenant d'un site contaminé en pesticides dans la rivière Yamaska et chez la perchaude provenant de milieux contaminés par les métaux et les pesticides dans le fleuve Saint-Laurent. Des études effectuées en laboratoire ont révélé que plusieurs pesticides et autres contaminants environnementaux ont la capacité de perturber la voie menant à la synthèse du cortisol chez le poisson (Benguira *et al.*, 2002; Bisson et Hontela, 2002). Une autre étude a relié cette perturbation endocrinienne au stress oxydatif dans le tissu interrénal secondairement à l'exposition aux polluants agricoles (Dorval *et al.*, 2005). Enfin, cette perturbation de la réponse au stress peut provenir de l'effet d'un stress chronique ou de l'effet d'un perturbateur endocrinien présent dans le milieu.

L'activité des enzymes branchiales Na^+/K^+ -ATPase est plus élevée pour les perchaudes de la rivière Yamaska. Plusieurs études montrent que des contaminants environnementaux tels que les pesticides (Sancho *et al.*, 2003) et les métaux lourds (de la Torre *et al.*, 2000) peuvent inhiber l'activité de cette enzyme. Or, dans la rivière Yamaska, l'enzyme n'était pas inhibée. Son activité était plutôt deux fois plus élevée. Des résultats similaires ont été montrés par l'exposition chronique au métolachlore de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) dans le cadre de cette maîtrise (voir chapitre I). L'activation du système d'osmorégulation pourrait être une conséquence d'une perturbation interne de l'osmolarité. En fait, certains pesticides

peuvent affecter la fonction rénale du poisson de même que la perméabilité tissulaire au niveau des branchies. L'atrazine, un herbicide présent dans la rivière Yamaska, provoque des changements ultrastructuraux considérables dans le tissu rénal de la truite arc-en-ciel, lorsqu'exposée en concentration sous-létale (Fischer-Scherl *et al.*, 1991). De plus, des composants présents dans la formulation des herbicides, tels que des solvants à base d'hydrocarbure aromatiques, peuvent augmenter la perméabilité des branchies et par le fait même, la perte d'électrolytes (Jackson et Fromm, 1977; McKeown et March, 1978; Heath, 1995). Il est donc possible que l'exposition au mélange de pesticides affecte l'osmolarité interne chez les perchaudes de la rivière Yamaska. L'augmentation de l'activité des enzymes Na^+/K^+ -ATPase des branchies permettrait alors de contrer la perte en électrolytes et de maintenir l'osmolarité plasmatique.

En conclusion de cette seconde campagne d'échantillonnage, les perchaudes vivant en milieu contaminé par les polluants agricoles ont une moins bonne condition. De plus, leur indice hépatosomatique plus élevé et l'accumulation de glycogène hépatique suggèrent une réponse à l'exposition aux contaminants. À cela s'ajoutent une perturbation de la réponse cortisolique et une activation du système d'osmorégulation possiblement reliée à une perturbation électrolytique.

Campagne n° 3

Pour cette campagne d'échantillonnage, le statut physiologique des perchaudes de la rivière Yamaska est comparé entre deux sites situés le long d'un gradient en pesticides. Le site de la branche nord de la rivière Yamaska (YAM-N) est faiblement contaminé par les pesticides et est utilisé comme site de référence (Tableau 2.3). Localisée au centre d'une agriculture intensive à Saint-Hugues, la rivière Yamaska (YAM-01) est contaminée par de nombreux pesticides.

Les perchaudes capturées au site YAM-01 sont en moyenne de plus petite taille que celles capturées au site de référence YAM-N. Par contre, le poids ajusté pour la longueur moyenne

est significativement plus élevé. Les perchaudes du site YAM-01 ont une condition significativement meilleure que celles capturées au site YAM-N. L'activité des cholinestérases plasmatiques tend à être plus faible au site YAM-01, mais cette différence n'est pas significative. L'indice hépatosomatique est significativement plus élevé au site YAM-01, par contre, il n'y a pas de différence quant au niveau de glycogène hépatique. Il y a de ce fait absence de relation entre le glycogène hépatique et l'indice hépatosomatique. Cette réponse pourrait, en partie, être expliquée par une augmentation du volume hépatique conséquemment à l'activation des mécanismes hépatiques permettant la détoxification du foie (Heath, 1995; van der Oost *et al.*, 2003).

La réponse au stress est beaucoup plus élevée pour les perchaudes de YAM-01. La capture a été effectuée à la pêche électrique. Il est possible que les perchaudes du site YAM-01 qui étaient de plus petites tailles, aient été plus affectées par le courant électrique. Malgré cela, ce résultat peut aussi révéler une inhibition de la réponse cortisolique chez les perchaudes de YAM-N. Selon l'indice de qualité bactériologique et physico-chimique du MDDEP, la qualité de l'eau de la rivière Yamaska Nord, était considérée douteuse ou mauvaise entre 1997 et 1998. On ne connaît toutefois pas la contamination réelle en 2003. Aux deux sites, les perchaudes avaient un métabolisme énergétique semblable. L'activité Na^+/K^+ ATPase des branchies étaient aussi similaire.

Les résultats de cette troisième campagne apportent des doutes dans l'utilisation du site YAM-N comme site de référence. En effet, le facteur de condition et le niveau de cortisol plasmatique sont plus faibles que ce qui est obtenu au site plus contaminé par les polluants agricoles. L'indice hépatosomatique est cependant plus faible.

2.7 CONCLUSION

Par l'utilisation d'une série de biomarqueurs, ce projet d'étude écotoxicologique a permis de dresser un portrait du statut physiologique de la perchaude exposée à une multitude de pesticides et autres polluants agricoles lors de la seconde campagne d'échantillonnage. Ainsi, cette exposition se traduit par une moins bonne condition, une tendance de diminution de l'activité des cholinestérases plasmatiques, une réponse au stress perturbée, une augmentation de l'IHS, une accumulation de glycogène hépatique et une activité plus élevée des enzymes Na^+/K^+ -ATPase.

Les perchaudes capturées à la fin de l'été 2002 au lac Brome étaient en moins bonne condition que celles provenant du site contaminé par les polluants agricoles dans la rivière Yamaska (YAM-03). De plus, l'activité des cholinestérases plasmatiques était plus faible, suggérant une exposition à un agent inhibiteur des cholinestérases autre que les pesticides. Comme des cyanobactéries étaient présentes au lac Brome durant cette campagne, il est possible que cette réponse provienne de l'effet des cyanotoxines. L'IHS plus élevé pourrait aussi être un effet possiblement dû à l'exposition aux cyanotoxines. Puisque la présence de cyanobactéries au site de référence peut être un facteur confondant sur les biomarqueurs utilisés, il est difficile d'interpréter les résultats comme un effet des polluants agricoles au site de l'embouchure YAM-03.

Une situation similaire est survenue pour la troisième campagne d'échantillonnage. Cette fois aussi les perchaudes étaient en meilleure condition au site le plus contaminé par les pesticides YAM-01 qu'au site de référence YAM-N. Toutefois, leur indice hépatosomatique était plus élevé. Leur réponse au stress était plus élevée qu'au site de référence, qui lui semblait perturber cette réponse cortisolique.

Enfin, cette étude écotoxicologique démontre l'importance du choix du site de référence. De plus, elle démontre la difficulté de relier les effets sur les biomarqueurs à la contamination environnementale puisque ces effets diffèrent souvent de ceux obtenus en milieu contrôlé. A chaque campagne d'échantillonnage, l'IHS était différent entre les deux sites. Toutefois, il ne

variait pas de la même façon avec la présence ou non de la contamination environnementale. De plus amples recherches sur les fonctions hépatiques ainsi que des études histologiques permettraient de vérifier si l'augmentation du volume hépatique est un résultat de l'activation des mécanismes de défenses ou d'une pathologie. Elles permettraient aussi de déterminer les causes de l'accumulation du glycogène hépatique associée à la présence de certains toxiques. Une étude histologique du tissu rénal permettrait de déterminer si l'activation des enzymes Na^+/K^+ ATPases dans les branchies résulte d'une altération ultra structurale de ce tissu.

Compte tenu des multiples facteurs environnementaux ainsi que l'évolution temporelle du statut physiologique des poissons, l'interprétation de résultats provenant des études environnementales est complexe. Toutefois, elles démontrent réellement l'effet du milieu sur les biomarqueurs. Les nombreuses connaissances acquises sur le portrait des biomarqueurs en relation avec la contamination environnementale en polluants agricoles permettront, à l'aide d'études ultérieures, de relier le portrait des biomarqueurs à la santé des poissons.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les deux volets de l'étude ont permis de mettre en évidence que l'exposition aux pesticides et autres polluants agricoles affecte le statut physiologique des poissons d'eau douce. Toutefois, les résultats ont montré que les effets de l'exposition à un herbicide en laboratoire et les effets de l'exposition aux polluants agricoles en milieu naturel peuvent être différents et même contradictoires. De plus, ces résultats n'ont pas toujours été dans le sens des hypothèses de départ. Ceci a été le cas notamment pour la condition générale du poisson qualifiée avec le facteur de condition. L'exposition au métolachlore et aux polluants agricoles devait négativement affecter la condition des poissons. Les truites arc-en-ciel ont été très tolérantes à l'exposition au métolachlore en laboratoire. Elles ont survécu 30 jours à une concentration de 800 µg/L et ce, sans perte de poids ou d'appétit. Le facteur de condition des truites était significativement plus faible suivant l'exposition à 500 µg/L de métolachlore. Cependant, sa valeur était comparable à la valeur de référence suite à l'exposition à 800 µg/L. La valeur du biomarqueur facteur de condition était peut-être biaisée par une accumulation d'eau dans les tissus à cette concentration ce qui pourrait augmenter le poids du poisson (Heath, 1995). Des analyses du contenu hydrique tissulaire pourraient aider à vérifier cette hypothèse. Dans la rivière Yamaska, les perchaudes étaient négativement affectées par le site YAM-02 contaminé par la pollution agricole. En plus de l'effet potentiel direct des pesticides sur la croissance du poisson, la diminution de la condition peut être expliquée par une ressource alimentaire différente entre les deux sites échantillonnés. De plus, la présence d'herbicide en milieu aquatique est dommageable pour la croissance de certaines algues (Fairchild *et al.*, 1997). Ainsi, la perturbation de la production primaire affecte la chaîne trophique tout entière. En conséquence, la ressource alimentaire du poisson est aussi affectée.

La réponse au stress s'est manifestée différemment suite à l'exposition au métolachlore en laboratoire et à l'exposition aux polluants agricoles en milieu nature. Il est clair que l'exposition des truites au métolachlore en laboratoire n'a pas affecté la réponse au stress par une diminution de cortisol plasmatique, comme il a été démontré pour certains métaux ou

pesticides perturbateurs endocriniens. L'exposition au métolachlore à la plus haute concentration a plutôt rendu les truites plus sensibles au stress de capture (cortisol très élevé comparativement au contrôle). Les perchaudes de la rivière Yamaska ont eu une réponse au stress plus faible. Un résultat similaire a été obtenu par Dorval *et al.* (2005) avec des meuniers noirs capturés dans la rivière Yamaska. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette réponse. Cela peut indiquer la présence de perturbateur endocrinien dans leur milieu, l'effet d'un épuisement de l'axe hypothalamo-hypophyso-interrénal causé par un stress chronique ou l'augmentation du métabolisme et de la clairance de l'hormone cortisol (Hontela *et al.* 1995).

Les résultats obtenus pour l'activité de l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase des branchies ont été contraires à ce qui était attendu. Compte tenu de la vulnérabilité de l'enzyme à plusieurs types de contaminants tels que les métaux et les pesticides, l'activité de cette enzyme devait être plus faible dans le milieu le plus contaminé (Sancho *et al.*, 2003; Waring *et al.*, 2004). Or, les deux types d'exposition ont montré une activation de l'enzyme en présence de pesticides. Ainsi, il est possible que cette activation soit une réponse adaptative permettant de contrer un déséquilibre électrolytique. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une analyse approfondie du système de l'osmorégulation.

Plusieurs auteurs mentionnent que le glucose sanguin est relié au cortisol plasmatique et diminue avec la baisse de cortisol plasmatique (Lockhart *et al.*, 1972; Bleau *et al.*, 1996). L'exposition des truites au métolachlore ou des perchaudes aux polluants agricoles en milieu naturel n'a pas eu d'effet significatif sur leur niveau de glucose plasmatique. Ceci a été observé même si le niveau de cortisol était plus élevé (exposition au métolachlore) ou plus faible (exposition aux polluants agricoles en milieu naturel). La sensibilité de ce biomarqueur de même que l'importance de son utilisation sont donc discutables.

Il était attendu que le glycogène hépatique diminue suivant l'exposition au métolachlore ou aux polluants agricoles. Plusieurs auteurs montrent que la réserve énergétique diminue suite à l'exposition chronique aux contaminants (Dange, 1986; Bleau *et al.*, 1996; Ricard *et al.*,

1998; Lévesque *et al.*, 2003; de Aguiar *et al.*, 2004). Le glycogène a effectivement diminué lors de l'exposition au métolachlore en laboratoire. Cela pourrait être associé à l'utilisation des réserves énergétiques pour l'activation des mécanismes de détoxification. En milieu naturel, le contraire a été observé. Le niveau de glycogène hépatique était plus élevé au site contaminé par les polluants agricoles qu'au site de référence. L'accumulation de glycogène hépatique chez les poissons exposés à certains toxiques est mal comprise. Toutefois, cet effet est fortement relié au niveau de pesticides dans le foie des poissons et pourrait traduire une perturbation des fonctions hépatiques (Roche *et al.* 2002). Des analyses de la charge du foie en pesticides auraient pu confirmer cette affirmation. Il est aussi possible que la présence d'un perturbateur endocrinien, en affectant l'axe HHI, affecte subséquemment la mobilisation des réserves énergétiques.

L'activité des cholinestérases plasmatiques n'a pas été affectée par le métolachlore puisque cet herbicide n'est pas un inhibiteur des cholinestérases. Dans la rivière Yamaska, une diminution a été observée. Toutefois, cette réponse n'est pas significativement différente. Pourtant, une inhibition significative a été retrouvée chez les meuniers noirs capturés en 2002 dans la rivière Yamaska près du site YAM-02 (Dorval *et al.* 2005). Les perchaudes sont peut-être moins sensibles aux inhibiteurs de cholinestérases que les meuniers noirs. La valeur de l'activité des cholinestérases plasmatiques est très faible et variable chez la perchaude.

Tel qu'il était attendu, une diminution de l'hématocrite a été observée suite à l'exposition au métolachlore en laboratoire. Cet effet est caractéristique de cet herbicide qui a la capacité de se lier aux globules rouges (U.S. EPA, 2001). Cependant, il y a eu une augmentation de l'hématocrite à la concentration de métolachlore la plus faible (200 µg/L). Cette concentration n'est pas largement au dessus des concentrations environnementales. De plus, en milieu naturel, les poissons des rivières contaminées par les pesticides sont exposés durant une période beaucoup plus longue. Il est donc possible que ce type d'effet soit aussi retrouvé en milieu naturel.

Quant au biomarqueur indice hépatosomatique, celui-ci diminue avec une augmentation de la concentration de métolachlore dans l'eau, en laboratoire. Le contraire a plutôt été observé dans la rivière Yamaska. Comme mentionné plus tôt, l'indice hépatosomatique varie en partie avec la concentration de glycogène hépatique (Goede et Barton, 1990; Roman et Dixon, 1996). Cependant, l'IHS peut aussi varier avec l'intensité du métabolisme de détoxification hépatique (Heath, 1995). Ainsi, voilà deux raisons possibles de l'augmentation de cet indice chez les perchaudes de la rivière Yamaska lors de la deuxième campagne.

En conclusion, en plus d'affecter la condition générale des poissons, les pesticides et autres polluants agricoles ont des effets non négligeables sur plusieurs systèmes. Ils affectent le métabolisme hépatique et énergétique, le système hormonal et le système d'osmorégulation. Malgré l'importance des connaissances apportées, il n'est pas possible, avec les biomarqueurs utilisés, de donner une évaluation de l'état de santé des poissons. Il est seulement possible de donner le portrait des biomarqueurs utilisés. Malgré tout, ces deux volets du projet de maîtrise permettent d'accroître les connaissances sur l'impact de la pollution agricole sur le statut physiologique des poissons. D'autres études pourront approfondir les systèmes étudiés afin de relier ces états à une condition de santé.

PERSPECTIVES

Ce projet de maîtrise a permis d'évaluer plusieurs cibles métaboliques pouvant être affectées par les pesticides et autres polluants agricoles. Il a permis de dresser un portrait des effets d'une exposition chronique, en milieu contrôlé, au métolachlore chez la truite arc-en-ciel (voir Appendice A) et d'évaluer le statut physiologique des perchaudes dans la rivière Yamaska. Pour renforcer l'interprétation des résultats dans de futures études, il serait souhaitable de déterminer l'âge des poissons par une lecture des anneaux de croissance de l'opercule lors d'étude en milieu naturel. De plus, l'interprétation des résultats serait facilitée par la détermination de la concentration des pesticides dans le foie des poissons ainsi que l'étude histologique de cet organe. Il serait également important d'évaluer l'osmolarité plasmatique du poisson ainsi que le contenu hydrique tissulaire afin de renforcer l'hypothèse de perturbation osmotique interne reflétée par une activation des enzymes branchiales Na^+/K^+ -ATPases. L'analyse du contenu hydrique tissulaire permettrait aussi de déterminer dans quelle mesure il est relié au facteur de condition. Le métabolisme énergétique mérite aussi une analyse approfondie, afin de comprendre pourquoi les réserves de glycogène hépatique sont affectées chez les perchaudes de la rivière Yamaska. Il en est ainsi du système sanguin compte tenu de l'augmentation de l'hématocrite chez les truites arc-en-ciel lors de leur exposition à 200 $\mu\text{g/L}$ de métolachlore.

APPENDICE A

SYNTHÈSE DES EFFETS DE L'EXPOSITION CHRONIQUE AU MÉTOLACHLORE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL

À la lumière des résultats obtenus avec l'étude de l'exposition des truites arc-en-ciel au métolachlore, celui-ci semble déstabiliser l'équilibre osmotique interne chez le poisson (voir Figure A-1). Ceci est montré par l'activation des enzymes d'osmorégulation des branchies. De plus, la baisse des réserves énergétiques dans le foie confirme une utilisation de l'énergie rapidement mobilisable à des fins d'adaptation au stress chimique créé par le métolachlore (activation des processus de détoxication ou bien d'osmorégulation). Le métolachlore a un effet particulier sur l'hématocrite en stimulant à concentration plus faible et en diminuant le pourcentage de globules rouges à plus grande concentration. L'anémie pourrait être expliquée par l'hémolyse causé par le stress oxydatif dans les globules rouges et par une perturbation du tissu rénal hématopoïétique entraînant une diminution de la synthèse des globules rouges.

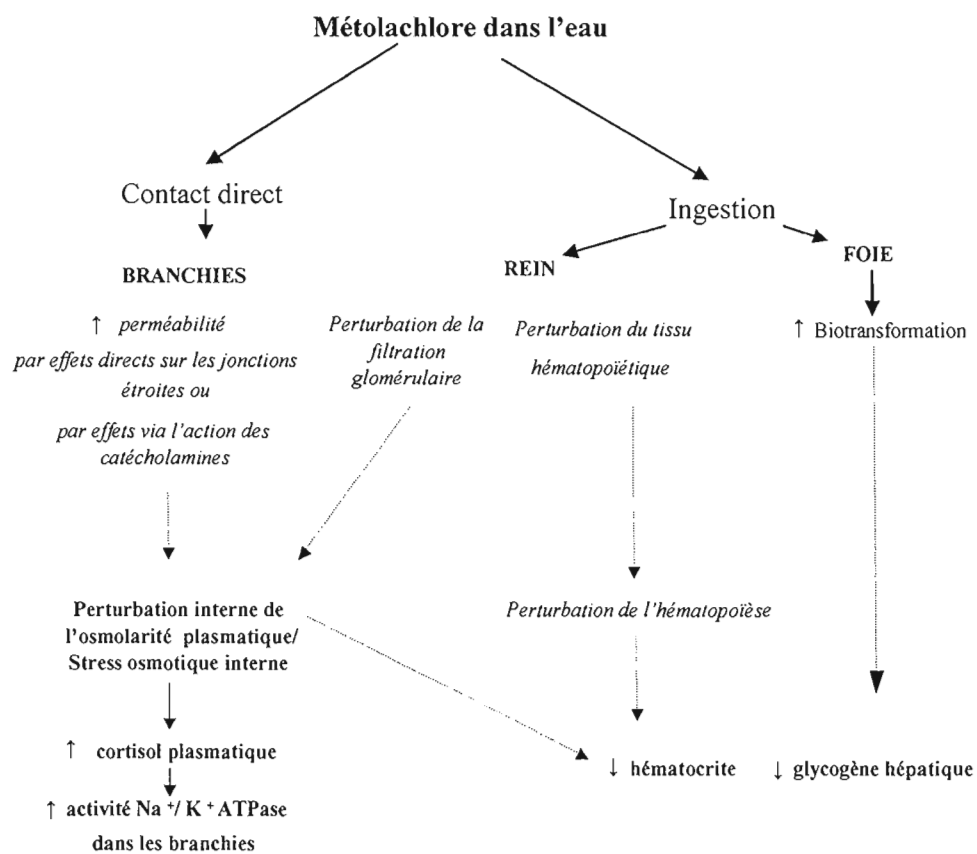


Fig. A-1 Synthèse des effets de l'exposition chronique au métolachlore (en milieu contrôlé/eau douce) chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) sur les différents biomarqueurs utilisés et effets proposés en italique

APPENDICE B

IDENTIFICATION D'UN POISSON D'EAU DOUCE EN GUISE DE SENTINELLE POUR L'ÉVALUATION DE LA PRÉSENCE D'INHIBITEUR DES CHOLINESTÉRASES EN MILIEU AQUATIQUE

Cette section fait mention des résultats sommaires d'une petite étude connexe qui a été ajoutée à la première campagne. Cette étude visait à évaluer l'activité des cholinestérases plasmatiques chez diverses espèces de poissons en milieu fréquemment contaminé par les pesticides agricoles (la rivière Yamaska, dans la ville de Yamaska et à son embouchure) et en milieu exempt de pesticides, le lac Brome. Enfin, cette étude est peut-être une nouvelle piste dans l'évaluation des milieux aquatiques contaminés par les pesticides.

Cette section entre dans le cadre de suggestions pour l'évaluation de cholinestérases plasmatiques chez les poissons d'eau douce. À la lumière des résultats obtenus pour l'analyse des cholinestérases plasmatiques lors de la campagne d'échantillonnage du 30 septembre au 6 octobre 2002, il semblerait que certaines espèces de poisson, notamment le brochet (*Esox lucius*), puissent être plus sensibles aux inhibiteurs de cholinestérases, dont les pesticides carbamates et organophosphorés font partie (Figure B-1). En effet, tandis qu'aucune différence d'activité des cholinestérases plasmatiques ($P=0,4039$) n'a été décelée chez la perchaude capturée aux mêmes sites (référence vs contaminé), les brochets étaient beaucoup plus sensibles. Ceux-ci avaient une diminution de l'activité des cholinestérases plasmatiques allant jusqu'à 92% plus faible que les brochets capturés dans le milieu de référence exempt de pesticide qu'est le lac Brome ($P=0,0067$), et ce, pour un poids moyen semblable voir la figure B-2.

Plusieurs caractéristiques font du brochet l'espèce sentinelle idéale pour l'évaluation des cholinestérases. L'activité des cholinestérases plasmatiques chez le brochet est beaucoup plus élevée que chez la perchaude, ce qui facilite l'analyse en laboratoire. Cette différence entre les espèces de poisson a aussi été révélée dans les travaux de Chuiko (2000) et Chuiko *et al.*, (2003). De plus, le brochet est un poisson prédateur. Ainsi, étant situé au statut trophique le

plus élevé, il a une plus grande tendance à bioaccumuler certains contaminants (Burreau *et al.*, 2004). Le niveau de contaminant accumulé dans le poisson pourrait par le fait même accentuer les effets de ceux-ci (Vojinovicmiloradov *et al.*, 1992). Ceci est peut-être une des raisons pour laquelle une différence significative est décelée pour le brochet (Figure B-1). En ajout, le brochet est résistant aux manipulations. Il serait donc possible d'effectuer une ponction sanguine et de le remettre par la suite en liberté. De plus, vu le poids moyen des brochets capturés, environ 230 grammes, il serait possible de recueillir au moins 1 ml de sang, ce qui faciliterait aussi les analyses en laboratoire.

Ainsi, dans le cadre d'une évaluation environnementale visant à déceler la présence en milieu aquatique d'inhibiteurs des cholinestérases, il serait intéressant d'évaluer la possibilité d'utiliser le brochet comme espèce sentinelle. Celui-ci permettrait de détecter plus facilement la présence d'inhibiteur de cholinestérases dans l'environnement aquatique.

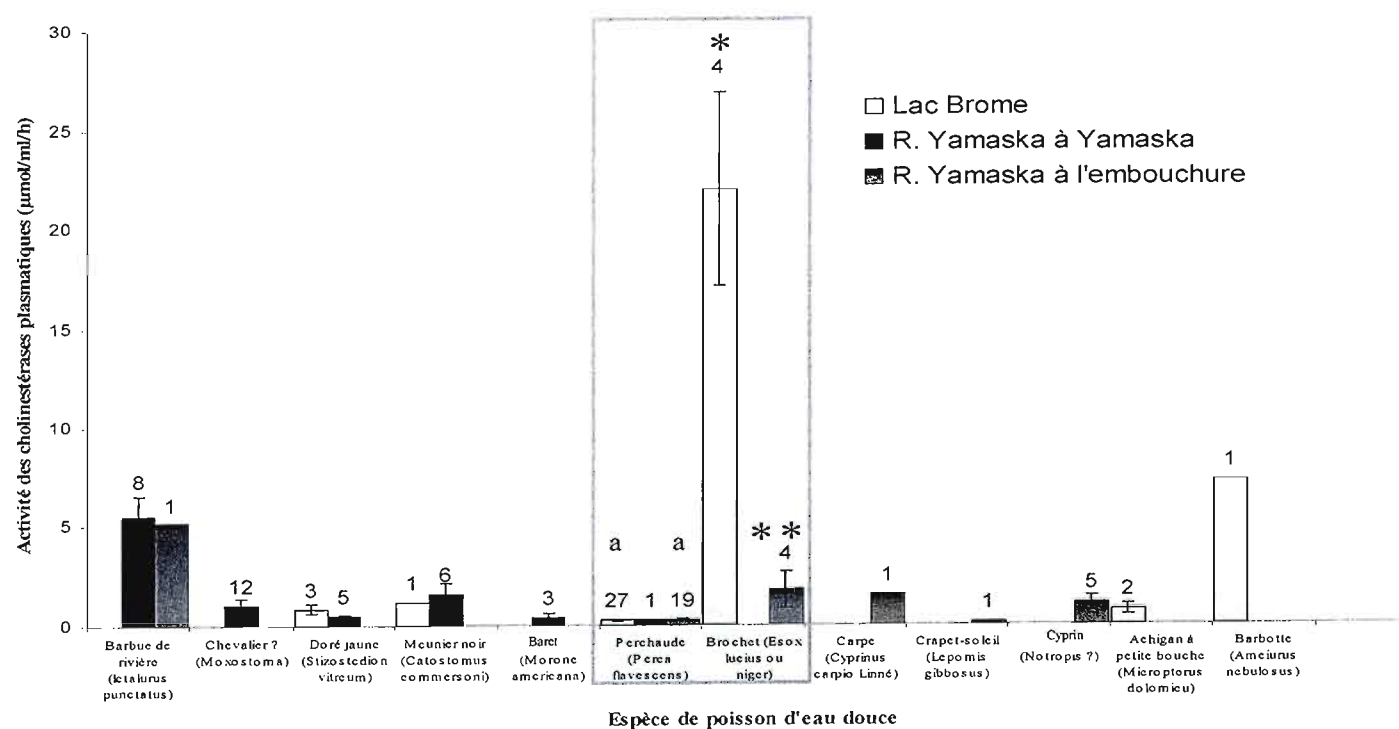


Fig. B-1 Activité des cholinestérases plasmatiques (moyenne \pm SD) pour plusieurs espèces de poissons capturés du 30 septembre 2002 au 6 octobre 2002 dans la rivière Yamaska (milieu contaminé par les pesticides) et dans le lac Brome (site de référence exempt de pesticides). (a) Aucune différence significative t : $P=0,4039$, (*) différence significative t : $P=0,0067$. Le nombre de poissons échantillonnés (N) est au-dessus des barres.

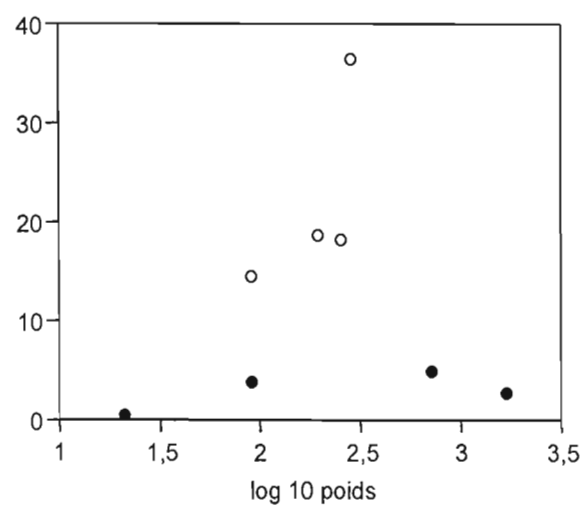


Figure B-2 Activité des cholinestérases plasmatiques chez le brochet capturé en milieu contaminé par les pesticides, Rivière Yamaska (●) et en milieu exempt de pesticides, lac Brome (○) en fonction du log 10 poids (g) .

RÉFÉRENCES

- Aalto, S.K. et Newsome, G.E. 1990. Additional evidence supporting endemic behaviour of a yellow perch (*Perca flavescens*) population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47: 1959-1962.
- Alvarez, M.D. et Fuiman, L.A. 2005. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquatic Toxicology*. 74 (3) 229-241.
- Battaglin, W.A., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R. et Peter, C.J. 2000. Occurrence of sulfonyleurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of The Total Environment*. 248 (2000) 123-133.
- Benguira, S., Leblond, V.S., Weber, J.P. et Hontela, A. 2002. Loss of capacity to elevate plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with a single injection of *o,p'*-dichlorodiphenyldichloroethane. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (8) 1753-1756.
- Bisson, M. et Hontela, A. 2002. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 180 (2) 110-117.
- Bleau, H., Daniel, C., Chevalier, G., van Tra, H. et Hontela, A. 1996. Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, T3, T4, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 34 (3) 221-235.
- Boily, M.H., Bérubé, V.E., Spear, P.A., DeBlois, C. et Dassylva, N. 2005. Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (5) 1099-1106.
- Bollag, J.M., McGahen, L.L., Minard, R.D. et Liu, S.Y. 1986. Bioconversion of alachlor in an anaerobic stream sediment. *Chemosphere*. 15: 153-162.
- Bradford, C.S., Fitzpatrick, S.M. et Schreck, C.B. 1992. Evidence for ultra-short-loop feedback in ACTH-induced interrenal steroidogenesis in coho salmon: Acute self-suppression of cortisol secretion *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*. 87: 292-299.
- Breuner, C.W. et Orchinik, M. 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *Journal of Endocrinology*. 175 (1) 99-112.
- Brodeur, J.C., Sherwood, G., Rasmussen, J.B. et Hontela, A. 1997. Impaired cortisol secretion in yellow perch (*Perca flavescens*) from lakes contaminated by heavy

- metals: *In vivo* and *in vitro* assessment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 54: 2752-2758.
- Burreau, S., Zebuhr, Y., Broman, D. et Ishaq, R. 2004. Biomagnification of polychlorinated biphenyls (PCBS) and polybrominated diphenyl ethers (PBDES) studied in pike (*Esox lucius*), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) from the Baltic Sea. *Chemosphere*. 55 (7) 1043-1052.
- Bury, N.R., McGeer, J.C., Eddy, F.B. et Codd, G.A. 1997. Liver damage in brown trout, *Salmo trutta* L, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following administration of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR via the dorsal aorta. *Journal of Fish Diseases*. 20 (3) 209-215.
- Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). 2001. *Canadian environmental quality guidelines: Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life*. Winnipeg. Manitoba.
- Carruth, L.L., Jones, R.E. et Norris, D.O. 2000. Cell density and intracellular translocation of glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in the kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka kennerlyi*) brain, with an emphasis on the olfactory system. *General and Comparative Endocrinology*. 117 (1) 66-76.
- Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. 2006. Détermination des pesticides de type aryloxyacide extraction avec C-18 suivie d'une estérification ; dosage par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. MA. 403-P. Chlp 2.0. Rév. 3. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec. 23 p.
- Chakraborti, P.K., Weisbart, M. et Chakraborti, A. 1987. The presence of corticosteroid receptor activity in the gills of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *General and Comparative Endocrinology*. 66 (3) 323-332.
- Chevalier, P., Pilote, R. et Leclerc, J.-M. 2001. Risques à la santé publique découlant de la présence de cyanobactéries (algues bleues) toxiques et de microcystines dans trois bassins versants du sud-ouest québécois tributaires du fleuve Saint-Laurent. Unité de recherche en santé publique (Centre hospitalier de l'Université Laval) et Institut national de santé publique. 151 p.
- Chuiko, G.M. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: Specific activities and *in vitro* inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*. 127: 233-242.
- Chuiko, G.M., Podgornaya, V.A. et Zhelnin, Y.Y. 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: Cross-species and cross-family differences. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*. 135: 55-61.

- Clark, G.M. et Goolsby, D.A. 2000. Occurrence and load of selected herbicides and metabolites in the lower Mississippi River. *Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 101-113.
- Coote, D.R. et Gregorich, L.J. 2000. La santé de l'eau - vers une agriculture durable au Canada. Direction de la planification et de la coordination de la recherche, Direction générale de la recherche. Agriculture et Agroalimentaire Canada. Ottawa. 200 p.
- Cruz, S.M., Scott, M.N. et Merritt, A.K. 1993. Metabolism of [^{14}C] metolachlor in bluegill sunfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41 (4) 662-668.
- Dange, A.D. 1986. Changes in carbohydrate metabolism in tilapia, (*Oreochromis sarotherodon mossambicus*), during short-term exposure to different types of pollutants. *Environmental Pollution, Series A*. 41 (2) 165-177.
- Davies, P.E., Cook, L.S.J. et Goenarso, D. 1994. Sublethal responses to pesticides of several species of Australian fresh-water fish and crustaceans and rainbow-trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 13 (8) 1341-1354.
- de Aguiar, L.H., Moraes, G., Avilez, I.M., Altran, A.E. et Correa, C.F. 2004. Metabolical effects of Folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxá (*Brycon cephalus*). *Environmental Research*. 95 (2) 224-230.
- de la Torre, F.R., Salibian, A. et Ferrari, L. 2000. Biomarkers assessment in juvenile (*Cyprinus carpio*) exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution*. 109 (2) 277-282.
- Delisle, F., Gariépy, S. et Bédard, Y. 1998. Bassin versant de la rivière Yamaska : L'activité agricole et ses effets sur la qualité de l'eau. Ministère de l'Environnement et de la faune et Saint-Laurent Vision 2000. 124p.
- Dhillon, S.S., et Gupta, A.K. 1983. A clinical approach to study the pollutants intoxication in a freshwater teleost (*Clarias batrachus*). *Water, Air and Soil Pollution*. 20 (1) 63-68.
- Dierickx, P.J. 1999. Glutathione-dependent cytotoxicity of the chloroacetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor in rat and human hepatoma-derived cultured cells. *Cell Biology and Toxicology*. 15 (5) 325-332.
- Dionne, E. 1978. Chronic toxicity of CGA-24705 to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *EG &G Bionomics*. 100-587.
- Dorval, J., Leblond, V., Deblois, C. et Hontela, A. 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24 (5) 1273-1280.

- Dorval, J., Leblond, V.S. et Hontela, A. 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology*. 63 (3) 229-241.
- Dutta, H. 1994. Growth in fishes. *Gerontology*. 40 (2-4) 97-112.
- Ellman, G.L., Courtney, K., L., Andres, V. et Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of Ache activity. *Biochemistry and Pharmacology*. 7: 88-95.
- Evans, D.H. 2002. Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*. 293: 336-347.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. et Choe, K.P. 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*. 85 (1) 97-177.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M. et Potts, W.T.W. 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*. 283: 641-652.
- Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S. et Carlson, A.R. 1997. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 32 (4) 353-357.
- Ferrando, M.D. et Andreumoliner, E. 1992. Lindane-induced changes in carbohydrate-metabolism in (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*. 101 (2) 437-441.
- Fischer-Scherl, T., Veaser, A., Hoffmann, R.W., Kühnhauser, C., Negele, R.-D. et Ewringmann, T. 1991. Morphological effects of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology (Historical Archive)*. 20 (4) 454-461.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R. et Nisbet, R.M. 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *The Science of The Total Environment*. 317 (1-3) 207-233.
- Foreman, W.T., Majewski, M.S., Goolsby, D.A., Wiebe, F.W. et Coupe, R.H. 2000. Pesticides in the atmosphere of the Mississippi River Valley, part II - Air. *The Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 213-226.
- Frank, R., Clegg, B.S. et Patni, J.K. 1991. Dissipation of cyanazine and metolachlor on a clay loam soil, Ontario, Canada, 1987-1990. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology*. 21: 253-262.
- Gerstl, Z. 1991. *Chemistry, agriculture and the environment*. The Royal Society of Chemistry. Londre. 546 p.

- Girard, C., Brodeur, J.C. et Hontela, A. 1998. Responsiveness of the interrenal tissue of yellow perch (*Perca flavescens*) from contaminated sites to an ACTH challenge test *in vivo*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 55 : 438-450.
- Giroux, I. 2002. *Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec, campagnes d'échantillonnage de 1999, 2000 et 2001, et évolution temporelle de 1992 à 2001*. Québec. Ministère de l'Environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Envirodoq n° EN/2002/0365. rapport n° QE/137. 45p. + 5 annexes.
- Giroux, I. 2004. La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec. Ministère de l'environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Envirodoq n° ENV/2004/0309. 40 p.
- Goede, R.W. et Barton, B.A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *American Fisheries Society Symposium*. 8: 91-108.
- Goolsby, D.A., Thurman, E.M., Pomes, M.L., Meyer, M.T. et Battaglin, W.A. 1997. Herbicides and their metabolites in rainfall: Origin, transport, and deposition patterns across the Midwestern and Northeastern United States, 1990-1991. *Environmental Science & Technology*. 31 (5) 1325-1333.
- Graymore, M., Stagnitti, F. et Allinson, G. 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*. 26 (7-8) 483-495.
- Heath, A.G. 1995. *Water pollution and fish physiology, seconde édition*. Floride. 359 p.
- Hébert, S. 1997. Développement d'un indice de la qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau pour les rivières du Québec. Québec. Ministère de l'Environnement et de la Faune. Direction des écosystèmes aquatiques. Envirodoq n° EN/970102. 20 p. 4 annexes.
- Henriksen, P., Carmichael, W.W., An, J. et Moestrup, O. 1997. Detection of an anatoxin-a(s)-like anticholinesterase in natural blooms and cultures of cyanobacteria/blue-green algae from Danish lakes and in the stomach contents of poisoned birds. *Toxicon*. 35 (6) 901-913.
- Hontela, A. 1997. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones. *Environmental Toxicology: Reviews in Toxicology*. 1: 1-46.
- Hontela, A., Daniel, C. et Rasmussen, J.B. 1997. Structural and functional impairment of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish exposed to bleached kraft mill effluent in the St.Maurice River. *Ecotoxicology*. 6: 1-12.

- Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D. et Fortin, R. 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to organic contaminants and heavy-metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 14 (4) 725-731.
- Hontela, A., Rasmussen, J.B., Audet, C. et Chevalier, G. 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 22 (3) 278-283.
- Jackson, W.F. et Fromm, P.O. 1977. Effect of a detergent of flux of tritiated water into isolated perfused gills of rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 58 (2) 167-171.
- Jarrard, H.E., Delaney, K.R. et Kennedy, C.J. 2004. Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology*. 69 (2) 133-148.
- Jefcoate, C. 2002. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. *Journal of clinical investigation*. 110 (7) 881-890.
- Jobling, S. et Tyler, C.R. 2003. Endocrine disruption in wild freshwater fish. *Pure and Applied Chemistry*. 75 (11-12) 2219-2234.
- Kelly, J. et Wood, C.M. 2001. Effect of cortisol on the physiology of cultured pavement cell epithelia from freshwater trout gills. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 282: R811-R820.
- Kent, R.A., Pauli, B.D., Trotter, D.M. et Gareau, J. 1991. Canadian water quality guidelines for metolachlor. Water quality branch. Scientific series. Ottawa.
- Klaassen, C.D. 1996. *Casarett and Doull's toxicology : The basic science of poisons*. 5th ed McGraw-Hill. New York. 1111 p.
- Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T. et Zaugg, S.D. 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of The Total Environment*. 328 (1-3) 119-130.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M. et Linhart, S.M. 2000. Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. *Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 115-122.
- Lacroix, M. et Hontela, A. 2003. The organochlorine *o,p'*-DDD disrupts the adrenal steroidogenic signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 190 (3) 197-205.

- Laflamme, J.S., Couillard, Y., Campbell, P.G.C. et Hontela, A. 2000. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 57 (8) 1692-1700.
- Laviolette, N. 1999. Le bassin de la rivière Yamaska: Les communautés ichthyologiques et l'intégrité biotique du milieu. Section 6 dans: Le bassin de la rivière Yamaska: État de l'écosystème aquatique. Ministère de l'environnement. Direction des écosystèmes aquatiques. Québec.
- Leblond, V.S., Bisson, M. et Hontela, A. 2001. Inhibition of cortisol secretion in dispersed head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by endosulfan, an organochlorine pesticide. *General and Comparative Endocrinology*. 121 (1) 48-56.
- Leblond, V.S. et Hontela, A. 1999. Effects of *in vitro* exposures to cadmium, mercury, zinc, and 1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed interrenal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 157 (1) 16-22.
- Lévesque, H.M., Dorval, J., Hontela, A., Van Der Kraak, G.J. et Campbell, P.G.C. 2003. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*. 66 (7) 657-676.
- Lockhart, W.L., Uthe, J.F., Kenney, A.R. et Mehrle, P.M. 1972. Methylmercury in northern pike (*Esox lucius*): Distribution, elimination, and some biochemical characteristics of contaminated fish. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*. 29: 1519-1523.
- Madsen, S., Jensen, M., Nohr, J. et Kristiansen, K. 1995. Expression of Na⁺-K⁺ATPase in the brown trout, *Salmo trutta* : *In vivo* modulation by hormones and seawater. *American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 269: R1339-R1345.
- Mahmood, N.A. et Carmichael, W.W. 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon*. 25 (11) 1221-1227.
- Majewski, M.S., Foreman, W.T. et Goolsby, D.A. 2000. Pesticides in the atmosphere of the Mississippi River Valley, part I: Rain. *The Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 201-212.
- Mancera, J.M., Carrion, R.L. et del Pilar Martin, M.R. 2002. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*. 129 (2) 95-103.
- Marsigliante, S., Barker, S., Jimenez, E. et Storelli, C. 2000. Glucocorticoid receptors in the euryhaline teleost *Anguilla anguilla*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 162: 193-201.

- McKeown, B.A. et March, G.L. 1978. The acute effect of bunker C oil and an oil dispersant on: serum glucose, serum sodium and gill morphology in both freshwater and seawater acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research*. 12 (3) 157-163.
- McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Luxon, P.L. et Van Der Kraak, G.J. 1994. Impact of low-level sampling stress on interpretation of physiological responses of white sucker exposed to effluent from a bleached kraft pulp mill. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 27: 251-264.
- Mikaelian, I., de Lafontaine, Y., Harshbarger, J., Lee, L. et Martineau, D. 2002. Health of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) with elevated tissue levels of environmental contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21 (3) 532-541.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. et Moon, T.W. 1999. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 9 (3) 211-268.
- Osano, O., Nzyuko, D., Tole, M. et Admiraal, W. 2003. The fate of chloroacetanilide herbicides and their degradation products in the Nzoia basin, Kenya. *Ambio*. 32 (6) 424-427.
- Palace, V.P., Majewski, H.S. et Klaverkamp, J.F. 1993. Interactions among antioxidant defenses in liver of rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50 (1) 156-162.
- Peterson, D.E., Regehr, D.L. et Thompson, C.R. 2001. *Herbicide mode of action*. Kansas State University. 24 p.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Appleby, A. et Yeomans, W.E. 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity : Is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? *General and Comparative Endocrinology*. 120: 108-117.
- Ricard, A.C., Daniel, C., Anderson, P. et Hontela, A. 1998. Effects of subchronic exposure to cadmium chloride on endocrine and metabolic functions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 34 (4) 377-381.
- Rice, C.P. et Chernyak, S.M. 1997. Marine arctic fog: An accumulation of currently used pesticides. *Chemosphere*. 35 (4) 867-878.
- Richards, R.P., Kramer, J.W., Baker, D.B. et Krieger, K.A. 1987. Pesticides in rainwater in the Northeastern United States. *Nature*. 327: 129-131.
- Roche, H., Buet, A. et Ramade, F. 2002. Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area: The French

- national nature reserve of Camargue. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 133 (3) 393-410.
- Rolland, A., Bird, D.F. et Giani, A. 2005. Seasonal changes in composition of the cyanobacterial community and the occurrence of hepatotoxic blooms in the Eastern townships, Quebec, Canada. *Journal of Plankton Research*. 27 (7) 683-694.
- Roman, P.L. et Dixon, D.C. 1996 Chronic toxicity of waterborne thiocyanate to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 53: 2137-2146.
- Ruane, N.M., Wendelaar Bonga, S.E. et Balm, P.H.M. 1999. Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology*. 115 (2) 210-219.
- Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D. et Andreu-Moliner, E. 2003. Eel Atpase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56 (3) 434-441.
- Santé Canada. 2004. *Résumé des recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada*. Préparé par le comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable du comité fédéral-provincial-territorial sur la santé et l'environnement. Ottawa. En ligne. <www.hc-sc.gc.ca/eauqualite>. Consulté le 15/10/04
- Schmalfuss, J., Matthes, B., Knuth, K. et Böger, P. 2000. Inhibition of Acyl-CoA elongation by chloroacetamide herbicides in microsomes from leek seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 67: 25-35.
- Scott, W.B. et Crossman, E.J. 1974. Poissons d'eau douce du Canada. Office des recherches sur les pêcheries du Canada. Ottawa. 1026 p.
- Scribner, E.A., Thurman, E.M. et Zimmermann, L.R. 2000. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *Science of The Total Environment*. 248 (2-3) 157-167.
- Shaner, D.L. 2003. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. *Pest Management Science*. 60 : 17-24.
- Stajner, D., Popovic, M. et Stajner, M. 2003. Herbicide induced oxidative stress in lettuce, beans, pea seeds and leaves. *Biologia plantarum*. 47 (4) 575-579.
- Takacs, P., Martin, P.A. et Struger, J. 2002. *Pesticides in Ontario: A critical assessment of potential toxicity of agricultural products to wildlife, with consideration for endocrine disruption*. Dans volume 2: Triazine herbicides, glyphosate and

- metolachlor. Rapport technique no. 369. Service Canadien de la Faune. Région de l'Ontario. Burlington. Ontario. Canada. 127 p.
- Thompson, H.M. 1999. Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology*. 8 (5) 369-384.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1987. *Pesticide fact handbook*. Noyes Data Corporation. New Jersey. 529 p.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1995. *R.E.D. Facts - metolachlor*. 14 p.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2001. *The grouping of a series of chloroacetanilide pesticides based on a common mechanism of toxicity*. Health Effects Division. Office of Pesticide Programs. Washington. DC.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2002. *Metolachlor. Analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead*. Environmental Field Branch. Office of Pesticide Programs. Washington. DC. 80 p.
- United State, Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2004. *Pesticides industry sales and usage 2000 and 2001 market estimates*. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Office of Pesticides Programs. Biological and Economic Division Analysis Division. Washington, DC. 48 p.
- van der Oost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13 (2) 57-149.
- van der Oost, R., Heida, H., Opperhuizen, A. et Vermeulen, N.P.E. 1992. *Bioaccumulation of organic micropollutants in different aquatic organisms: Sublethal toxic effects on fish*. Dans: Aquatic toxicology and risk assessment. Mayes, M. A. et Barro, M. G. eds. ASTM International. p. 385
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S. et Leatherland, J.F. 1991. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *General and Comparative Endocrinology*. 82: 476-486.
- Vijayan, M.M., Reddy, P.K., Leatherland, J.F. et Moon, T.W. 1994. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout : A study using the steroid analogue RU486. *General and Comparative Endocrinology*. 96: 75-84.
- Voet, D. et Voet, J.G. 1998. *Biochimie*. DeBoeck Université. Paris. 1361 p.
- Vojinovicmiloradov, M., Marjanovic, P., Buzarov, D., Pavkov, S., Dimitrijevic, L. et Miloradov, M. 1992. Bioaccumulation of polychlorinated-biphenyls and organochlorine pesticides in selected fish species as an indicator of the pollution of

aquatic resources in Vojvodina, Yugoslavia. *Water Science and Technology*. 26 (9-11) 2361-2364.

World Health Organization (W.H.O.) 2003. *Metolachlor in drinking-water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality*. Geneve. En ligne www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/metolachlor.pdf. Consulté le 5/10/05.

Walker, C. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor& Francis. London. 321 p.

Waring, C.P. et Moore, A. 2004. The effect of atrazine on atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquatic Toxicology*. 66 (1) 93-104.

Webster, E., Mackay, D. et Wania, F. 1998. Evaluating environmental persistence. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17: 2148-2158.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 77: 591-625.

Yamazaki, T., Shimodaira, M., Kuwahara, H., Wakatsuki, H., Horiuchi, H., Matsuda, H. et Kominami, S. 2005. Tributyltin disturbs bovine adrenal steroidogenesis by two modes of action. *Steroids*. 70: 913-921.